

Université de Montréal

Effet des épandages de lisier de porc et du travail du sol sur la présence de gènes de résistance aux antimicrobiens dans le sol et l'eau de drainage en grandes cultures

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

par Élodie Larouche

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade Maîtrise ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires option hygiène vétérinaire et innocuité des aliments

Décembre 2017

© Élodie Larouche, 2017

RÉSUMÉ

Les pratiques agricoles peuvent participer à la propagation des gènes de résistances aux antimicrobiens (GRAs) dans l'environnement. En effet, les épandages de lisier de porc introduisent des microorganismes résistants aux antimicrobiens dans le sol. Cette étude a permis d'évaluer l'impact d'épandages répétés de lisier de porc et du travail du sol sur la présence de GRAs dans le sol et l'eau de drainage en grandes cultures. Les bactéries *Escherichia coli* et entérocoques ont été dénombrées. Après l'extraction d'ADN, les gènes de résistance *tet(T)*, *sul1* et *bla_{CTX-M-1}* ont été quantifiés par qPCR. La détection des gènes *mcr-1* et *mcr-2* a été réalisée par PCR conventionnelle. D'après les résultats obtenus, l'épandage du lisier de porc à une dose élevée (45m³/ha) a eu un impact à long terme sur l'abondances des gènes *tet(T)* et *sul1* dans le sol. Une dose plus faible (20m³/ha) a eu un impact à court terme. L'abondance des gènes *sul1* dans l'eau de drainage a significativement diminué 15 jours après l'épandage comparé à 169 jours pour les gènes *tet(T)*. Le travail du sol n'a pas eu d'impact sur la présence et l'abondance des GRAs dans les échantillons. Les gènes *bla_{CTX-M-1}* ont été détectés dans le lisier et dans 7 échantillons d'eau, mais aucun lien n'a été établi avec les traitements. Les gènes *mcr-1* et *mcr-2* n'ont pas été détectés. Ce projet a permis de démontrer que le réservoir des gènes de résistance à la tétracycline et aux sulfamides dans le sol peut être augmenté après l'épandage répété de lisier à dose élevée.

Mots clés : Résistance aux antimicrobiens, gènes de résistance aux antimicrobiens, lisier de porc, eau de drainage, travail du sol, tétracyclines, β -lactamines, sulfamides, colistine.

ABSTRACT

Agricultural practices represent potential pathways for the propagation of antimicrobial resistance genes (ARGs) in the environment. Hog manure applications introduce antimicrobial resistant microorganisms to the soil. This study evaluated the impact of hog manure spreading and tillage practices on the presence of ARGs in soil and drainage water in field crops. *Escherichia coli* and enterococci bacteria were counted. After DNA extraction, *tet*(T), *sul*1 and *bla*_{CTX-M-1} resistance genes were quantified by qPCR. The detection of *mcr*-1 and *mcr*-2 genes was performed by conventional PCR. The results showed that high-dose manure application (45 m³/ha) had a long-term impact on *tet*(T) and *sul*1 genes abundance in soil. A dose of 20 m³/ha had a short-term impact. Gene abundance in drainage water decreased significantly 15 days after manure application for *sul*1 and 169 days for *tet*(T). Tillage practices did not have an impact on the presence and abundance of ARGs in samples. The *bla*_{CTX-M-1} genes were detected in hog manure and in 7 water samples, but no link was established with the treatments. The *mcr*-1 and *mcr*-2 genes were not detected. This study demonstrated that tetracycline and sulfonamide resistance genes reservoir in soil can be increased after repeated high doses swine manure applications.

Key words: Antimicrobial resistance, antimicrobial resistance genes, liquid hog manure, drainage water, tillage, tetracyclines, β -lactams, sulfonamides, colistin.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES SIGLES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION	1
1. RESCENSION DE LA LITTÉRATURE	5
1.1 Surveillance canadienne de la résistance aux antimicrobiens.....	6
1.2 Description de la résistance aux antimicrobiens	7
1.2.1 Brève histoire des antimicrobiens.....	7
1.2.2 Résumé des mécanismes d'action des antimicrobiens.....	8
1.2.3 Description générale des mécanismes de résistance	12
1.2.4 Transferts de gènes de résistance entre microorganismes	14
1.2.5 Familles d'agents antimicrobiens utilisées en médecine humaine et vétérinaire.....	19
1.3 La résistance aux antimicrobiens en élevage	34
1.3.1 Les antimicrobiens utilisés en production porcine.....	34
1.3.2 Profils de résistance chez les porcs	36
1.4 L'environnement comme réservoir de GRAs.....	38
1.4.1 Réservoir naturel de ces gènes.....	38
1.4.2 La résistance aux agents antimicrobiens liée aux pratiques d'épandage d'engrais de ferme	39
1.5 Méthodes de détection de la résistance aux antimicrobiens	46
1.5.1 Méthodes de microbiologie.....	46
1.5.2 Méthodes de biologie moléculaire	46
1.5.3 Microorganismes indicateurs de contamination fécale	47
2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	49
3. ARTICLE SCIENTIFIQUE	51
Abstract.....	53

Importance	54
Introduction.....	55
Results.....	58
Discussion.....	62
Acknowledgements.....	67
Materials and methods.....	68
Tables & figures	72
Supplementary materials.....	81
4. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	86
4.1 Interprétation des résultats	87
4.2 Aspects innovateurs	90
4.3 Limites de l'étude	91
4.4 Directions futures.....	93
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	98

LISTE DES TABLEAUX

Revue de littérature

Tableau I. Classification des antimicrobiens selon leur niveau d'importance en médecine humaine selon Santé Canada	20
Tableau II. Gènes de résistance aux antimicrobiens classés en fonction de la famille d'antimicrobiens et leur mécanisme de résistance.....	21
Tableau III. Principaux antimicrobiens utilisés pour le traitement des infections bactériennes aux États-Unis et au Canada pour l'élevage des porcs	36

Article scientifique

Table 1. Protocol and primers selected for the quantitative PCR.....	72
Table 2. <i>E. coli</i> population in soil by sampling date and depth	73
Table 3. Enterococci population in soil by sampling date and depth	74
Table 4. <i>E. coli</i> population in drainage water at each drains flow event	75
Table 5. Enterococci population in drainage water at each drains flow event	76
Table 6. Abundance of tetracycline and sulfonamide resistance genes in soil.....	77
Table 7. Abundance of tetracycline and sulfonamide resistance genes in drainage water	78

Supplementary materials

Table S1. Weather at the experimental site of Saint-Lambert-de-Lauzon, Quebec, Canada	82
Table S2. Nucleotide sequence used as standard qPCR curve	83
Table S3. Sequence of the lambda gene fragment.....	84
Table S4. Liquide hog manure composition	85

LISTE DES FIGURES

Revue de littérature

Figure 1. Mécanismes d'action des antimicrobiens	9
Figure 2. Principaux mécanismes de transfert de gènes dans une bactérie impliquant la transduction, la transformation et la conjugaison comme voie de transfert	15
Figure 3. Exemples d'antimicrobiens de la famille des macrolides	24
Figure 4. Exemples d'antimicrobiens de la famille des β -lactamines	26
Figure 5. Exemples d'antimicrobiens de la famille des aminoglycosides	30
Figure 6. Exemples d'antimicrobiens de la famille des quinolones	32

Article scientifique

Figure 1. <i>tet(T)</i> gene abundance in the soil surface (0 to 10 cm)	79
Figure 2. <i>sulI</i> gene abundance in the soil surface (0 to 10 cm).....	80

Supplementary materials

Figure S1. Monthly drainage water flow	81
--	----

LISTE DES SIGLES

ASPC	Agence de la santé publique du Canada
CRAAQ	Centre de Référence en Agriculture et Agroalimentaire du Québec
CRSV	Chaire de recherche en salubrité des viandes
IRDA	Institut de recherche et de développement en agroenvironnement
OMS	Organisation mondiale de la santé
PICRA	Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens

LISTE DES ABRÉVIATIONS

<i>aac</i>	Gène de résistance aux aminoglycosides
<i>AAC</i>	Gène de résistance aux quinolones
<i>aad</i>	Gène de résistance aux aminoglycosides
<i>aaph</i>	Gène de résistance aux aminoglycosides
ABC	Famille de pompes efflux « ATP-binding cassette »
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	« analysis of variances »
ARN	Acide ribonucléique
<i>bla</i>	Gène de résistance aux β -lactamines codant pour une BLSEs
BLSEs	β -lactamases à spectre étendu
CTX-M	Phénotype d'une BLSEs
<i>dfr</i>	Gène de résistance aux diaminopyrimidines
DHPS	Dihydroptéroate synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ere</i>	Gène de résistance aux macrolides codant pour une estérase
<i>erm</i>	Gène de résistance aux MLS _B codant pour une méthylase

GRAs	Gène de résistance aux antimicrobiens
<i>Inu</i>	Gène de résistance aux streptogramines A codant pour une transférase
<i>Isa</i>	Gène de résistance aux MLS _B codant pour une pompe ABC
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	Lipopolysaccharides
MATE	Famille de pompes efflux « multidrug and toxic compound extrusion »
<i>mcr</i>	Gène de résistance à la colistine codant pour transférase
<i>mef</i>	Gène de résistance aux MLS _B codant pour une pompe MFS
<i>mex</i>	Gène de résistance aux quinolones
MLS _B	Macrolides, lincosamides et streptogramines B
<i>mph</i>	Gène de résistance aux macrolides codant pour une phosphorylase
MRAs	Microorganismes résistants aux antimicrobiens
MFS	Famille de pompes efflux « major facilitator superfamily »
<i>oqx</i>	Gène de résistance aux quinolones
<i>otr</i>	Gène de résistance aux tétracyclines codant pour une pompe efflux
pABA	Acide <i>para</i> -aminobenzoïque
<i>pbp</i>	Gène de résistance aux β -lactamines codant pour des PBPs
PBPs	Enzymes « Penicillin binding proteins »

PCR	Polymerase chain reaction
<i>pmr</i>	Gène de résistance non constitutif aux polymyxines
<i>qnr</i>	Gène de résistance aux quinolones
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
RND	Famille de pompes efflux « resistance-nodulation-cell-division »
<i>rrnS</i>	Gène bactérien ciblant une petite sous-unité d'ADN ribosomique
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SMR	Famille de pompes efflux « small multidrug resistance »
<i>str</i>	Gène de résistance aux aminoglycosides
<i>sul</i>	Gène de résistance aux sulfamides codant pour une DHPS
<i>tet</i>	Gène de résistance aux tétracyclines
<i>van</i>	Gène de résistance aux glycopeptides
<i>vat</i>	Gène de résistance aux streptogramines A codant pour une transférase
<i>vga</i>	Gène de résistances aux MLS _B et aux streptogramines A
<i>vgb</i>	Gène de résistances aux MLS _B

It always seems impossible until it's done.

À mon fiancé qui me permet d'accomplir mes rêves!

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier ma directrice de recherche, Dre Caroline Côté, pour m'avoir fait confiance dans la réalisation de ce beau projet de maîtrise. Merci pour ta disponibilité, tes conseils précieux et ton écoute! Merci de m'avoir supportée et fait adorer la recherche!

Merci à mon cher codirecteur, Dr Sylvain Quessy, pour m'avoir aussi fait confiance pour la réalisation de ce projet. Tu m'as donné le goût de poursuivre mes études encore plus loin!

Merci à tous ceux qui ont participé à la réalisation de ma maîtrise. Merci à l'équipe du Laboratoire en Hygiène de l'Environnement Agricole (LHEA) de l'IRDA pour m'avoir aidé au champ et au laboratoire! Merci à mes collègues de la CRSV pour leur aide et conseils. Je vous remercie d'avoir été disponible pour mes nombreuses questions.

Merci à Guy Beauchamp pour ses précieuses analyses statistiques.

Merci au Ministère de l'agriculture des pêcheries et de l'alimentation du Québec (MAPAQ) pour leur contribution financière au projet.

Merci aux membres de mon comité-conseil et aux membres du jury d'évaluation de ce mémoire.

Merci à toute ma famille de m'avoir encouragée. Un merci spécial à ma mère et à mes parents adoptifs qui ont su être à mes côtés malgré les 300 km qui nous séparent.

Merci à l'homme de ma vie d'avoir cru en moi et supportée dans la réalisation de mes projets! Je n'aurais pas réalisé toutes ces belles choses sans toi.

INTRODUCTION

Les agents antimicrobiens sont utilisés pour le traitement de nombreuses infections bactériennes chez les humains et les animaux. La diminution de leur efficacité pour traiter les infections chez les humains et les animaux entraîne des conséquences telles qu'une augmentation des coûts et de la durée des traitements ainsi que des taux élevés de mortalité et de morbidité (1,2). Ces agents antimicrobiens sont aussi utilisés pour prévenir les infections et favoriser la croissance en élevage de porcs (3). Les tétracyclines, les sulfamides, les macrolides, les lincosamides, les polypeptides, les streptogramines ainsi que les β -lactamines sont toutes des familles d'antimicrobiens autorisées pour traiter les infections et pouvant être ajoutées dans les rations alimentaires afin de favoriser la croissance des porcs au Canada (4,5). La résistance aux antimicrobiens est un problème de santé publique à l'échelle mondiale depuis plusieurs années (1,2). L'utilisation de ceux-ci a exercé une pression de sélection chez les microorganismes et a conduit à l'apparition de nouvelles souches résistantes. Le nombre et la diversité des microorganismes pathogènes résistants aux antimicrobiens (MRAs) se sont accrus depuis que ces composés ont été adoptés en médecine (6–8).

Les excréments d'animaux d'élevage sont une source de gènes de résistance aux antimicrobiens (GRAs) (9). Il a été démontré que l'épandage de fumiers introduit des microorganismes résistants et des résidus d'antimicrobiens pouvant exercer une pression de sélection pour l'acquisition de GRAs chez les microorganismes du sol (2,10–12). Des échanges génétiques peuvent contribuer à la propagation et la dissémination de la résistance antimicrobienne dans l'environnement. Ainsi, les épandages d'engrais organiques peuvent avoir un effet direct sur l'augmentation du réservoir environnemental des GRAs tout comme un effet indirect auprès des microorganismes déjà présents dans le sol et l'eau de drainage (6,13,14). En

fait, le sol est un réservoir naturel de GRAs. Plusieurs agents antimicrobiens utilisés aujourd'hui proviennent de microorganismes du sol, telle que la streptomycine qui a été isolée à partir du champignon *Streptomyces griseus* en 1944 (15). Les différentes méthodes de travail du sol sont aussi suspectées de jouer un rôle dans le transport des GRAs dans l'environnement par le biais de l'eau de drainage (1,16). Très peu d'informations sont disponibles en ce qui a trait aux impacts du travail du sol sur le transport des gènes dans l'environnement. Des études supplémentaires sont donc nécessaires afin de mieux évaluer l'impact des différents types de travaux du sol et de mieux comprendre le rôle des pratiques agricoles dans la propagation des GRAs dans l'environnement (16).

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Enterococcus* spp. sont souvent porteuses de GRAs et sont aussi utilisées comme indicateurs de contamination fécale (1,17,18). Dans le cadre de ce projet de maîtrise, la présence des gènes de résistance à la tétracycline a été évaluée. Les gènes de résistance codant pour une NADPH-oxydoréductase conduisant à une protection du ribosome, tels que les gènes *tet(T)*, ont été peu étudiés (23,24). La résistance aux sulfamides a été souvent évaluée en recherchant les gènes *sul1*, *sul2* et *sul3*. Le gène *sul1* est lié à un intégron de classe I et est généralement porté par des plasmides, ce qui le rend d'intérêt pour l'évaluation de l'impact d'épandages de fumiers et le potentiel de propagation de la résistance aux sulfamides dans l'environnement (25,26). La résistance aux β -lactamines, médiée entre autres par le gène *bla_{CTX-M-1}*, est très répandue. La dissémination des microorganismes résistants à la pénicilline et aux carbapénèmes dans le monde suggère la présence d'un réservoir environnemental de gènes de résistance aux β -lactamines (14). Enfin, la colistine sulfate (CS) est un antimicrobien dont l'utilisation est approuvée dans plusieurs pays (27,28). Cependant, il

n'est pas encore approuvé pour utilisation au Canada (83). Depuis la première identification en 2015 d'un gène de résistance à la colistine porté par un plasmide, *mcr-1*, l'environnement a été suspecté d'avoir un rôle dans la propagation de la résistance à la colistine (29). Cependant, le rôle des épandages du fumier sur les terres agricoles dans la propagation des microorganismes résistants à la colistine dans l'environnement n'a pas été étudié au Canada. À partir d'échantillons de lisier de porc, de sol et d'eau de drainage, cette étude a permis de suivre la présence des gènes *tet(T)*, *sul1*, *bla_{CTX-M}*, *mcr-1* et *mcr-2* sur des parcelles expérimentales ayant reçu des engrais minéraux ou du lisier de porc et travaillées de manière conventionnelle ou réduite durant plusieurs années. Des hypothèses ont été émises dans le cadre de ce projet de maîtrise. D'abord, l'épandage du lisier de porc augmente la quantité des GRAs dans le sol. Ensuite, le transport des MRAs dans l'eau de drainage est influencé par le mode de travail du sol. Les objectifs du projet étaient de déterminer l'impact d'épandages répétés de lisier de porc et du travail du sol sur la présence de GRAs dans le sol et l'eau de drainage en grandes cultures.

1. RESCENSION DE LA LITTÉRATURE

1.1 Surveillance canadienne de la résistance aux antimicrobiens

La résistance aux antimicrobiens représente une importante problématique à l'échelle mondiale. Au Canada, l'Agence de la Santé Publique du Canada (ASPC) a fait une analyse détaillée des agents pathogènes infectieux ayant déjà présenté une résistance aux antimicrobiens dans le monde (30). Parmi ces pathogènes, des bactéries qui sont présentes à la fois chez les humains et les animaux ont été ciblées pour faire l'objet d'une surveillance accrue au Canada, au regard de leur importance en santé publique. Les organismes ciblés sont les suivants :

- *Clostridium difficile*
- Organismes producteurs de β -lactamases à spectre étendu (BLSEs)
- Organismes résistants aux carbapénèmes tels que *Acinetobacter* et *Enterobacteriaceae* spp.
- *Enterococcus* spp.
- *Neisseria gonorrhoeae*
- *Streptococcus pyogenes* du groupe A et *Streptococcus pneumoniae*
- *Salmonella* spp.
- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)
- *Mycobacterium tuberculosis*
- *Campylobacter* spp.

Les bactéries *E. coli*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Shigella* sont les seuls microorganismes dont la résistance aux antimicrobiens a été largement étudiée. Selon l'ASPC, il y a des lacunes dans la surveillance des MRAs étant donné le nombre important de microorganismes dont la résistance n'a pas encore été vérifiée (30).

1.2 Description de la résistance aux antimicrobiens

1.2.1 Brève histoire des antimicrobiens

La découverte du premier antimicrobien à usage thérapeutique, la pénicilline, a été réalisée par Alexander Flemming en 1929. Ce composé a été découvert par hasard grâce au champignon *penicillium* qui contaminait les cultures de staphylocoques dorés. Flemming avait remarqué que les bactéries qui étaient autour d'une colonie du champignon *penicillium* avaient changées de couleur et étaient en voie de lyse cellulaire (15). La majorité des antimicrobiens a été découverte chez des microorganismes tels que des bactéries et des champignons qui sont présents naturellement dans l'environnement (7,31). Par exemple, en 1939, Gerhard Domagk a découvert la gramicidine à partir de *Bacillus brevis*, une bactérie du sol. En 1945, Giuseppe Brotzu a découvert la céphalosporine chez le champignon *Cephalosporium acremonium* qui est présent dans l'eau. Les années qui ont suivi ont été particulièrement fructueuses puisque la plupart des antimicrobiens connus aujourd'hui ont été découverts (15). Depuis les années 1990, il n'y a pas eu d'agents antimicrobiens appartenant à de nouvelles familles qui ont été isolés ou synthétisés pour des fins thérapeutiques (7).

Les antimicrobiens sont utilisés pour le traitement des infections bactériennes depuis environ 75 ans. Dès la première année, en 1945, l'utilisation à grande échelle de la pénicilline pour le traitement des infections à staphylocoque doré a laissé certains chercheurs inquiets. En effet, Alexander Fleming avait prédit l'apparition de bactéries pathogènes aux humains résistantes aux antimicrobiens utilisés. Ses inquiétudes se sont confirmées puisque quelques années plus tard, près de la moitié des souches de staphylocoques étaient devenues résistantes à

la pénicilline. Ce même phénomène a aussi été observé suite à l'utilisation de plusieurs autres antimicrobiens (15).

1.2.2 Résumé des mécanismes d'action des antimicrobiens

Les mécanismes d'action des antimicrobiens sont des processus qui dépendent de l'interaction physique entre la molécule antibactérienne et son site d'action à l'intérieur de la bactérie. Ces mécanismes complexes entraînent des réactions à des niveaux biochimiques et moléculaires. Les antimicrobiens peuvent agir en affectant la synthèse de la paroi bactérienne, de la membrane plasmique, des protéines et/ou la synthèse des acides nucléiques des bactéries (figure 1) (32,33). Ces molécules antimicrobiennes peuvent avoir un effet bactériostatique, c'est-à-dire que la croissance des bactéries est inhibée, ou un effet bactéricide qui conduit les bactéries à la mort cellulaire. La mort de la bactérie est généralement associée à un bris de l'ADN double-brin, d'une inhibition de l'ADN gyrase, d'un arrêt de la synthèse de l'ARN, d'une inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire et d'une perturbation de la synthèse des protéines. En fait, le traitement des infections avec des concentrations léthales d'antimicrobiens bactéricides mène à la production de radicaux hydroxyles nocifs causée par l'oxydation de composants de la voie de destruction cellulaire, entraînant ainsi la perturbation du métabolisme central (ex. perturbation du cycle de l'acide citrique) et du métabolisme du fer (32).

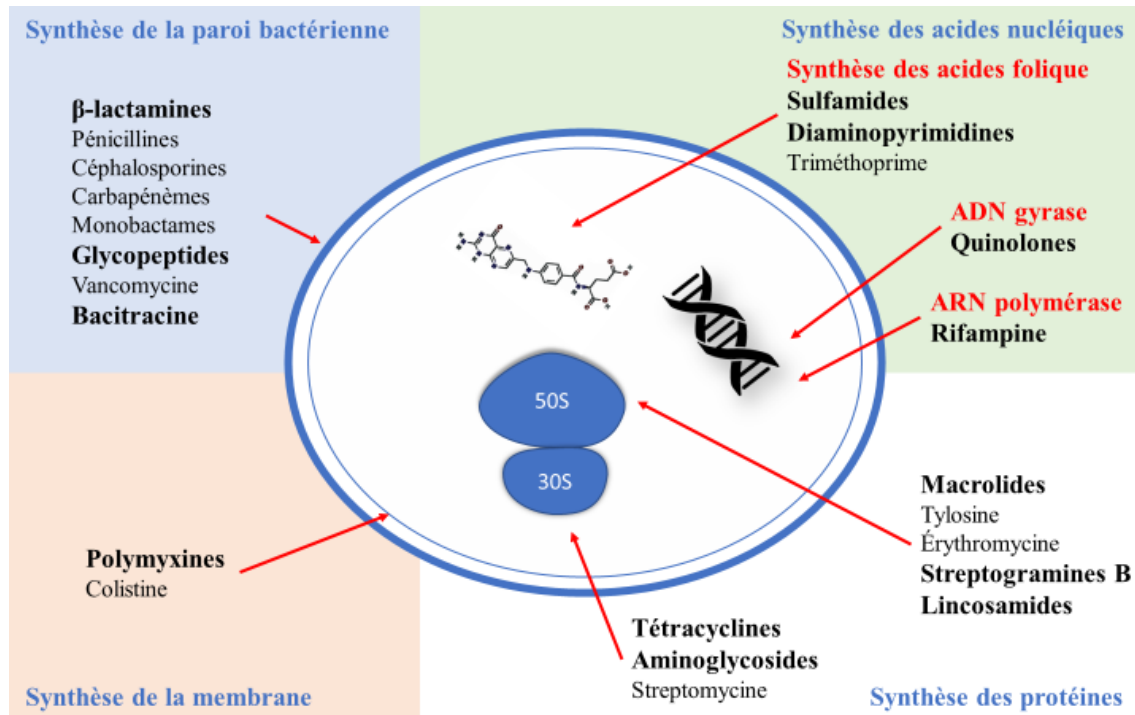


Figure 1. Mécanismes d'action des antimicrobiens (33).

1.2.2.1 Perturbation de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi cellulaire est constituée de peptidoglycanes. Lors de la synthèse de celle-ci, le peptidoglycane subit la réticulation des brins de glycanes par les transglycosidases et forme ainsi la chaîne peptidique. La partie D-alanyl D-alanine de la chaîne est réticulée par des résidus de glycine avec la présence de protéines de liaison à la pénicilline (PBPs), ce qui renforce la paroi cellulaire. Il existe neuf types de PBPs entrant dans la formation de la paroi. Les antimicrobiens de la famille des β -lactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en interférant avec les PBPs (ex. pénicillines), les rendant ainsi moins disponibles pour la liaison avec l'enzyme transglycosidase et la synthèse du peptidoglycane. Les antimicrobiens de la famille des

glycopeptides peuvent aussi perturber la synthèse de la paroi en entrant en compétition avec les PBPs au site de liaison de la partie D-alanyl D-alanine du précurseur de peptidoglycane (26,33).

1.2.2.2 Perturbation de la synthèse de la membrane bactérienne

La synthèse de la membrane d'une bactérie comprend entre autres la formation de lipopolysaccharide (LPS). La colistine, antimicrobien de la famille des polymyxines, est un polypeptide cationique qui agit en se fixant à un groupement phosphate négatif du LPS. Cette liaison altère la structure du LPS et augmente la perméabilité membranaire, pouvant ainsi mener à la lyse de la bactérie (33,34). Les aminoglycosides agissent en se liant d'abord aux composantes de la membrane bactérienne qui sont anioniques, augmentant ainsi la perméabilité membranaire (26).

1.2.2.3 Inhibition de la synthèse des protéines

La synthèse des protéines est réalisée au niveau du ribosome qui reçoit l'ARN messager et réalise la traduction des protéines. Le ribosome 70S est composé de deux sous-unités structurales 50S et 30S. La synthèse des protéines peut être inhibée lorsque les antimicrobiens se lient à ces deux sous-unités, ce qui modifie la conformation du ribosome et perturbe la traduction des ARN messagers (33). Les aminoglycosides agissent en se liant à la sous-unité 30S du ribosome causant ainsi une mauvaise lecture de l'ARN messager ou une fin prématurée de la traduction (26,35). Les tétracyclines empêchent la liaison de l'ARN de transfert au site A de la sous-unité 30S du ribosome. Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines B se

lient à la sous-unité 50S du ribosome et empêchent la translocation en ciblant l'ARN ribosomique 23S, causant ainsi le détachement prématuré des chaînes peptidiques (26,33).

1.2.2.4 Inhibition de la réplication d'ADN

La perturbation de la réplication d'ADN peut être réalisée par l'inhibition de l'enzyme ADN gyrase bactérienne, une topoisomérase II. Cette enzyme empêche le surenroulement positif excessif des brins lorsqu'ils se séparent afin de permettre la réplication ou la transcription de l'ADN. L'ADN gyrase est constituée de deux sous-unités A, qui coupent et rescellent les brins, et de deux sous-unités B qui introduisent des superenroulements négatifs. Les fluoroquinolones se lient à la sous-unité A avec une haute affinité et perturbe ainsi la coupe et le rescellement des brins d'ADN. Chez les bactéries à Gram négatif, la topoisomérase IV entaille et sépare les brins d'ADN filles après la réplication d'ADN. Les antimicrobiens, tels que les quinolones, possédant une plus grande affinité pour la topoisomérase IV peuvent aussi perturber la réplication de l'ADN (26,33,35).

1.2.2.5 Inhibition de la synthèse d'acide folique

L'acide folique ou folate intervient dans plusieurs processus biochimiques dans les cellules bactériennes. Les antimicrobiens appartenant aux familles des sulfamides et des diaminopyrimidines peuvent inhiber des étapes distinctes du métabolisme de l'acide folique et entraîner une carence en folates dans la cellule bactérienne. Les sulfamides sont des analogues structuraux de l'acide *para*-amino-benzoïque (pABA) et sont des inhibiteurs compétitifs de la dihydroptéroate synthase (DHPS) (25). L'enzyme dihydrofolate réductase joue un rôle à la fin

de la synthèse de l'acide folique et peut être inhibée par les diaminopyrimidines (ex. triméthoprimes) (33,36).

1.2.3 Description générale des mécanismes de résistance

Il existe de nombreux mécanismes de résistance. Les GRAs codent pour des molécules particulières qui permettent de neutraliser, modifier ou empêcher l'agent antimicrobien d'atteindre sa cible ainsi que d'inactiver ou éliminer les molécules antimicrobiennes (37).

1.2.3.1 Mécanismes de protection ribosomique

La protection au ribosome peut se faire soit en modifiant la conformation du ribosome, soit en produisant une molécule qui entre en compétition avec l'antimicrobien pour le site de liaison (8,26). La modification du site de fixation diminue son affinité avec la molécule antimicrobienne. Les gènes codant pour une protéine destinée à protéger le site de fixation de l'antimicrobien peuvent mener à une résistance aux tétracyclines et aux fluoroquinolones. La modification de la cible de la molécule antimicrobienne peut être réalisée par des mutations ponctuelles dans la séquence des gènes codants pour le site de fixation, par des altérations enzymatiques du site (ex. ajout de groupement méthyl) ou en remplaçant le site par un autre site de fixation ayant une plus faible affinité avec l'antimicrobien (37).

1.2.3.2 Mécanismes de réduction de la concentration de l'antimicrobien

Les bactéries peuvent devenir résistantes lorsqu'elles produisent des protéines de transport qui mènent l'antimicrobien hors de la cellule. Elles peuvent aussi produire des pompes à efflux qui réduisent la concentration intracellulaire de l'antimicrobien. Il y a des molécules antibactériennes qui ne peuvent simplement pas pénétrer la bactérie étant donné la modification du mécanisme de transport. Il peut y avoir également une modification du site de fixation de l'antimicrobien au ribosome (8,26,38). Il existe plusieurs pompes efflux permettant la réduction de l'accumulation des molécules antimicrobiennes dans la cellule. Les bactéries à Gram positif possèdent des pompes appartenant aux familles MFS (« major facilitator superfamily »), ABC (« ATP-binding cassette »), MATE (« multidrug and toxic compound extrusion ») et SMR (« small multidrug resistance »). Chez les bactéries à Gram négatif, ce sont les pompes appartenant aux familles RND (« resistance-modulation-cell-division »), ABC et MFS qui s'occupent de réduire la concentration de l'antimicrobien à l'intérieur de la bactérie (39).

1.2.3.3 Mécanismes de protection enzymatique

Certaines bactéries résistantes aux aminoglycosides et aux β -lactamines ont la capacité de produire des enzymes modifiées qui inactivent l'antimicrobien. En fait, une modification de la conformation de la molécule antimicrobienne, ou simplement par encombrement stérique, réduit partiellement ou complètement l'affinité de la molécule avec son site de liaison (8,26,39). D'autres bactéries résistantes aux β -lactamines peuvent produire des enzymes β -lactamases qui vont plutôt dégrader l'antimicrobien (37). Les principales réactions biochimiques catalysées par ces enzymes modifiées sont l'acétylation (ex. aminoglycosides, chloramphénicols,

streptogramines), la phosphorylation (ex. aminoglycosides, chloramphénicols) et l'adénylation (ex. aminoglycosides, lincosamides) (39).

1.2.4 Transferts de gènes de résistance entre microorganismes

Les échanges génétiques entre les microorganismes ne sont pas récents. En fait, ils sont depuis très longtemps un moyen d'acquérir de nouvelles propriétés afin de mieux s'adapter à l'environnement pour survivre. Les microorganismes sont confrontés à l'évolution par la sélection naturelle (18). La variation des caractères génétiques est influencée par les mutations ponctuelles et les échanges génétiques entre les microorganismes. Les voies de transferts horizontaux de gènes connus sont la transformation, la transduction et la conjugaison. Les transferts de GRAs sont principalement réalisés par des plasmides, des bactériophages ou par de l'ADN libre (figure 1) (37). Il faut noter qu'il est plutôt rare que l'ADN libre s'intègre dans un chromosome grâce aux mécanismes de transformation et de transduction. La majorité des échanges génétiques sont réalisés par le mécanisme de conjugaison (15,18).

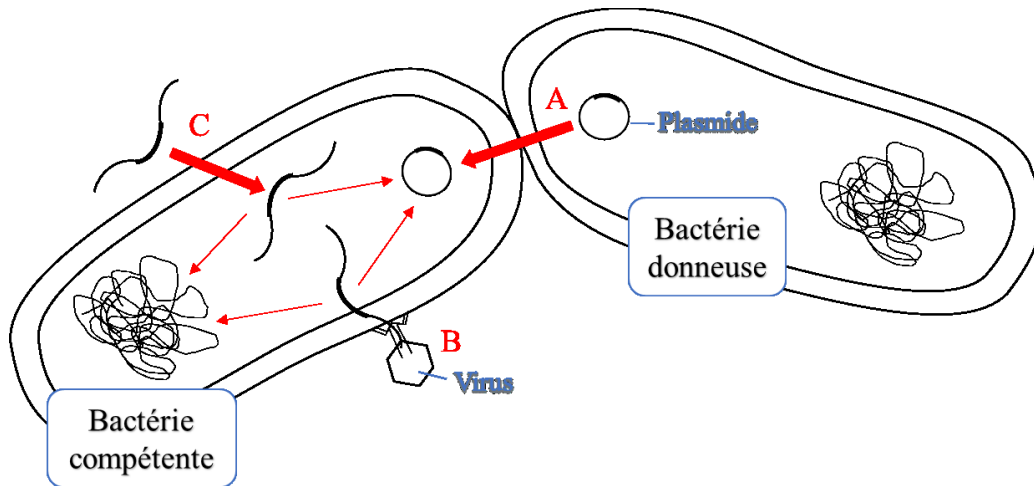


Figure 2. Principaux mécanismes de transfert de gènes dans une bactérie impliquant la transduction, la transformation et la conjugaison comme voie de transfert (37). **A)** Transferts d'ADN par des plasmides **B)** Transfert d'ADN par un bactériophage **C)** Acquisition d'ADN libre.

1.2.4.1 La transformation

Le transfert horizontal de gènes par transformation implique une molécule d'ADN qui pénètre dans une nouvelle bactérie, permettant ainsi l'insertion de celle-ci dans un plasmide ou, rarement, le chromosome. Des échanges de GRAs par ce mécanisme se font rarement. La transformation est un mécanisme qui se fait entre deux bactéries semblables dont l'une, bactérie compétente, reçoit l'ADN provenant de l'autre. L'ADN peut s'intégrer au génome de la nouvelle bactérie seulement lorsqu'elles sont suffisamment semblables (exemple : même espèce) puisque la dégradation du fragment d'ADN intrus peut être réalisée par une endonucléase ou une enzyme de restriction (15,40). Les plasmides peuvent aussi être échangés

par transformation. La transformation est le principal mécanisme qui permet les échanges de plasmides non conjugatifs (18).

1.2.4.2 La transduction

Le mécanisme d'échange génétique par transduction peut permettre l'insertion d'un gène dans le génome bactérien, mais nécessite un phage transducteur. L'intégration de l'ADN d'un phage chez une bactérie peut se faire à proximité d'un gène de résistance déjà présent. Lorsque le phage devient lytique, il emporte une partie du génome de la bactérie et infecte par la suite d'autres bactéries dans lesquelles il pourra ajouter un GRAs par recombinaison homologue (15).

1.2.4.3 La conjugaison

La transformation et la transduction impliquent des bactéries semblables tandis que le mécanisme de conjugaison, grâce aux plasmides bactériens, peut conduire à un transfert de gènes entre des bactéries très différentes. Il s'agit du mécanisme d'échange génétique le plus important quant à l'acquisition de GRAs chez de nouvelles souches bactériennes. Les échanges génétiques par conjugaison sont influencés par la présence d'éléments génétiques mobiles, c'est-à-dire des fragments de gènes qui se déplacent, tels que les plasmides, les transposons et les intégrons (40–42). Les plasmides se retrouvent en plusieurs copies chez la bactérie et se répliquent plus rapidement que le génome bactérien. De plus, il y a généralement plusieurs GRAs sur un même plasmide (15).

Les transposons ont joué un rôle important dans la survie des bactéries. La famille de transposons Tn21 est celle qui contient le plus de GRAs connus à ce jour. Ils sont en premier lieu des transposons qui peuvent induire une résistance au mercure, permettant ainsi la réduction de celui-ci dans les sols qui en contiennent beaucoup dû aux activités industrielles (18). Certains transposons possèdent des intégrons. Leur association est liée à la dissémination des GRAs. Les intégrons sont généralement situés dans le chromosome et sont non réplicatifs. Ces derniers codent pour des intégrases, enzymes qui contrôlent l'intégration ou l'excision de gènes. Ils sont en fait caractérisés par la présence d'un système de recombinaison spécifique leur permettant d'acquérir des gènes individuels ou des séquences qui contiennent des cassettes de gènes. Il y a plus de 100 classes d'intégrons, mais les plus connues et documentées sont celles qui sont caractérisées par les gènes *int1*, *int2* et *int3*. Les intégrons de la classe 1 sont ceux qui ont été le plus étudiés et ils sont hautement mobiles. Le gène *int1* est celui qui a été le plus détecté et associé à la propagation des GRAs chez les bactéries pathogènes à Gram négatif. Par contre, le fait que les autres classes soient moins présentes ou documentées ne veut pas dire qu'elles ne sont pas responsables de la dissémination de la résistance antimicrobienne. Des intégrons similaires ont été détectés dans des échantillons d'origine animale, humaine, alimentaire ou environnementale suggérant ainsi que des gènes sont échangés entre les bactéries provenant de différents milieux (18,43). Les intégrons de classe 1 sont aussi porteurs de résistance à l'ammonium quaternaire qui est souvent retrouvé dans les détergents ou les désinfectants. Il s'agit d'un ion ammonium qui conserve sa charge négative indépendamment du pH ou des conditions environnantes. Gaze et *al.* (2011) ont démontré qu'un environnement (sol, boues d'épuration, boues d'animaux) concentré en composés d'ammonium quaternaire et en résidus d'antimicrobiens contient davantage d'intégrons de classe 1 qu'un sol n'ayant pas reçu de

biocides et de boues. Ainsi, ils ont démontré que les intégrons de classe 1 peuvent se retrouver en grande quantité même en l'absence de pression de sélection exercée par des antimicrobiens (43).

1.2.4.4 Autres facteurs pouvant influencer l'acquisition de GRAs

Les GRAs peuvent se multiplier à l'intérieur des bactéries et devenir en quantité supérieure grâce à la croissance de celles-ci. Les gènes de résistance peuvent ainsi se propager chez d'autres populations microbiennes, ce qui augmente les probabilités de mutations et d'évolution de la résistance chez la population touchée (1). Lors de leur intégration, les gènes de résistance se retrouvent sous le contrôle d'autres gènes qui peuvent permettre de les activer. La différence d'expression des GRAs chez les microorganismes qui les ont acquis est liée au fait qu'ils peuvent se retrouver devant un promoteur faiblement ou fortement activé (15). En plus des transferts horizontaux de gènes, des mutations ainsi que des recombinaisons génétiques peuvent influencer les échanges entre les microorganismes. En présence d'une pression de sélection environnementale, les GRAs peuvent être davantage exprimés et répliqués afin de bien répondre aux conditions de stress (1). La présence d'un gène de résistance n'implique pas forcément l'expression de celui-ci. Ainsi, la détection des GRAs reflète simplement le potentiel de résistance d'un microorganisme et de l'environnement à lequel il appartient (19).

1.2.5 Familles d'agents antimicrobiens utilisées en médecine humaine et vétérinaire

Un classement des antimicrobiens a été fait par Santé Canada selon leur importance en médecine humaine et est présenté dans le tableau I ci-dessous. Les antimicrobiens de classe I sont ceux pour lesquels il n'existe pas ou très peu d'alternatives de traitement. La classe II réunit ceux pour lesquels peu d'alternatives sont disponibles et la classe III concerne ceux qui ont généralement plusieurs alternatives possibles. La classe IV a été créée pour les antimicrobiens qui ne sont pas utilisés en médecine humaine, mais qui le sont en médecine vétérinaire. Ils n'ont pas ou très peu d'importance pour le traitement des infections chez les humains (3). Plusieurs antimicrobiens utilisés chez les humains le sont aussi chez les animaux d'élevage.

Tableau I. Classification des antimicrobiens selon leur niveau d'importance en médecine humaine selon Santé Canada

Niveau d'importance de l'antimicrobien	Classe d'antimicrobiens
I	Carbapénèmes
	Fluoroquinolones
	Glycopeptides
	Nitroimidazoles (métronidazole)
	Polymyxines (colistine)
II	Céphalosporines de troisième et quatrième génération
	Aminoglycosides (sauf les agents topiques)
	Céphalosporines de première et deuxième génération
	Lincosamides
	Macrolides
	Pénicillines
	Quinolones (excepté les fluoroquinolones)
	Streptogramines
	Sulfaméthoxazole
III	Aminoglycosides (agents topiques)
	Bacitracines
	Sulfamides
	Tétracyclines
IV	Flavophospholipols
	Ionophores

Adapté de Chevalier (2012).

Le tableau II présente un classement des GRAs documentés en fonction de leur mécanisme général de résistance et de la famille d'agents antimicrobiens à laquelle ils appartiennent.

Tableau II. Gènes de résistance aux antimicrobiens classés en fonction de la famille d'antimicrobiens et leur mécanisme de résistance

Famille	Mécanisme	Gènes	Références
Tétracycline	Efflux	<i>tetA</i> (P), <i>tet</i> (A, B, C, D, E, G, H, J, K, L, P, V, Y, Z, 30, 31, 33, 35, 38, 39), <i>tcr3</i> , <i>otr</i> (B), <i>otr</i> (C)	(8,44)
	Modification de la cible	<i>tet</i> , <i>tet</i> (M, O, Q, S, T, W, 32, 36), <i>tetB</i> (P), <i>otr</i> (A)	(8,44)
	Protection enzymatique	<i>tet</i> (X), <i>tet</i> (34), <i>tet</i> (37)	(8,44)
	Inconnu	<i>tet</i> (U)	(8)
Macrolides	Inactivation enzymatique	<i>ere</i> (A, B), <i>mph</i> (A, B, C, D)	(45)
Macrolides Lincosamides Streptogramines B	Modification de la cible	<i>erm</i> (A, B, C, E, F, G, H, I, N, O, Q, R, S, T, U, V, W, X, Y, Z, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)	(16,19,24,45,46)
	Efflux	<i>mef</i> (A), <i>Isa</i> (A, B), <i>vga</i> (A) _{lc}	(16,45,47)
	Efflux	<i>vga</i> (A, B), <i>vga</i> (A) _{lc}	
Streptogramines A	Dégradation enzymatique	<i>Inu</i> (A, B, C, D, F), <i>vat</i> (A, B, C, D, E, F)	(24,45,47)
Streptogramines B	Protection enzymatique	<i>vgb</i> (A, B)	(16,24,45,47)
β-lactamines	Dégradation enzymatique (BLSEs)	<i>bla</i> _{CMY} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{GES} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{VEB}	(24,31)

	Inactivation enzymatique (PBP)	<i>pbp5</i>	(24,31,37)
Sulfamides	Protection enzymatique	<i>sul1, sul2, sul3, sulA</i>	(21,24,48,49)
Glycopeptides	Modification de la cible	<i>van</i> (A, B, C, D, E, G, L, M, N)	(24,50)
Aminoglycosides	Protection enzymatique	<i>aac</i> (C1, C2, C4), <i>aad</i> (A1, A2, A5), <i>aaphA6</i> , <i>str</i> (A, B)	(24,51,52)
Diaminopyrimidines		<i>dfr</i> (A7)	(48,53)
Quinolones	Modification de la cible	<i>qnr</i> (A, B, S), <i>AAC</i> (6)- <i>lb-cr</i> , <i>oqx</i> (B), <i>mexF</i>	(6,21,24,51)
Polymyxines	Modification de la cible	<i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>mcr-1</i> , <i>mcr-2</i> , <i>mcr-3</i> , <i>mcr-4</i>	(27,54–56)

Il existe différentes manières de classer les agents antimicrobiens. Ce document présente les classements rapportés en fonction de leur importance en santé publique. Le classement suivant des familles d'antimicrobiens a été réalisé en fonction du spectre d'action de l'antimicrobiens ou de sa structure chimique (57). Ce sont les familles qui ont été davantage documentées concernant la résistance antimicrobienne chez les microorganismes pathogènes pour les humains et les animaux qui se retrouvent dans le présent document.

1.2.5.1 Famille des tétracyclines

Les tétracyclines forment une famille d'antimicrobiens fréquemment utilisées en élevage au Canada (5). Ils sont utilisés contre les bactéries à Gram négatif ou positif, certains

protozoaires, les mycoplasmes, les chlamydias ainsi que les rickettsies. La première molécule antibactérienne de la famille des tétracyclines, la 7-chlorotétracycline, a été découverte en 1948. D'autres composés tels que la tétracycline et la minocycline ont ensuite fait leur apparition en médecine (58).

La résistance aux tétracyclines est médiée par des mécanismes efflux (diminution de la concentration de l'antimicrobien à l'intérieur de la cellule), des mécanismes de protection ribosomique et des mécanismes de protection enzymatique. Plusieurs gènes permettent de résister à l'action des tétracyclines. Le gène *tet(T)* permet la résistance aux tétracyclines par un mécanisme de protection du ribosome en produisant une protéine compétitrice qui empêchera l'antimicrobien de se lier à la sous-unité 30S du ribosome. Le gène *tet(T)* a été retrouvé sur un chromosome de *Streptococcus pyogenes*, une bactérie pathogène pour les humains qui se retrouve aussi chez les bovins. Les gènes de résistance aux tétracyclines peuvent se retrouver aussi sur des plasmides bactériens et sont souvent portés par des transposons (8,59). Le mécanisme de résistance le plus commun est celui qui tend à diminuer la concentration des tétracyclines à l'intérieur de la bactérie. Ce sont des gènes (ex. *tet(A)*) qui produisent des protéines de transport ou des pompes à efflux qui conduisent la molécule antimicrobienne à l'extérieur de la cellule bactérienne. Le mécanisme de protection enzymatique est plus rare chez les bactéries résistantes. Par exemple, pour neutraliser les tétracyclines, le gène *tet(X)* produit une NADPH-oxydoréductase afin d'inactiver la molécule antimicrobienne (8,26). Des études ont rapporté une résistance croisée aux macrolides et aux tétracyclines chez *Streptococcus pyogenes* entre les gènes *tet(O)* et *mef(A)* ou *erm(A)* qui ont été retrouvés sur le transposon

Tn1207 ainsi que *erm*(B) et *tet*(M) qui ont été retrouvés sur les transposons Tn1545, Tn3703, Tn3704, Tn3872 (60).

1.2.4.2 Famille des macrolides

Les macrolides sont troisièmes dans le classement des antimicrobiens les plus utilisés au Canada en élevage (5). Ils sont divisés en plusieurs classes en fonction de la taille du cycle lactone macrocyclique qu'ils contiennent (Figure 3) (26). Le cycle lactone contient aussi des sucres désoxy tels que le cladinose et le désosamine qui y sont liés par une liaison glycosidique. Les macrolides sont surtout efficaces contre les bactéries anaérobies ou aérobies à Gram positif, les mycoplasmes et les rickettsies (26,35,45).

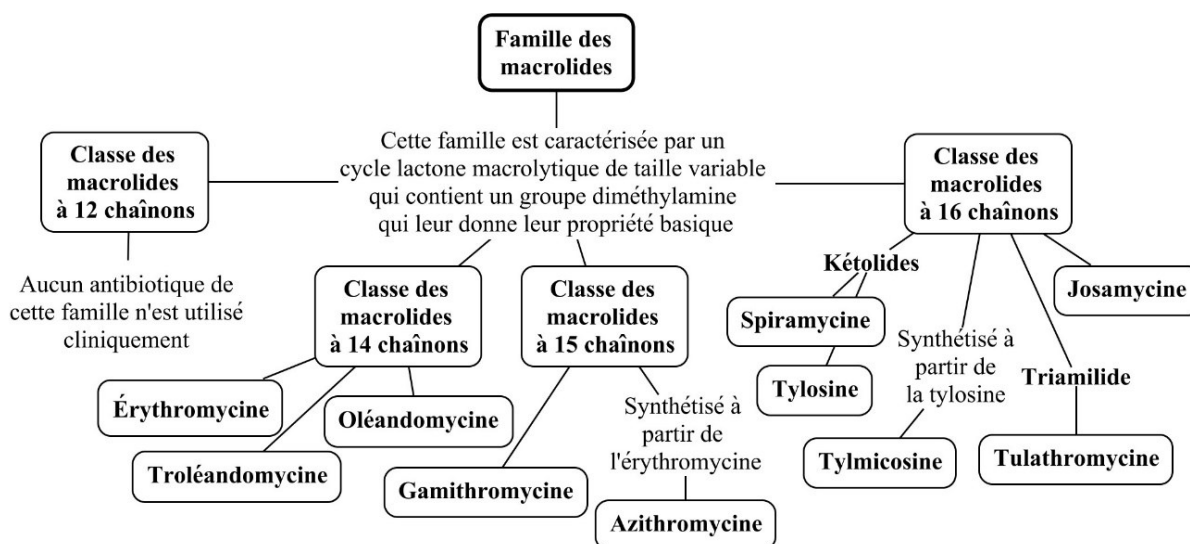


Figure 3. Exemples d'antimicrobiens de la famille des macrolides (26).

Les bactéries à Gram négatif sont généralement résistantes aux macrolides étant donné la présence d'une paroi cellulaire qui empêche l'entrée des macrolides dans la bactérie. Chez les bactéries à Gram-positif, une mutation ou une méthylation du site de fixation de l'antimicrobien modifie la structure du ribosome, empêchant ainsi les molécules antimicrobiennes de s'y fixer. Le mécanisme de résistance le plus fréquemment rencontré est la méthylation du résidu spécifique adénine A2058 sur l'ARN ribosomique 23S, empêchant ainsi l'érythromycine, la tylosine, les lincosamides et les streptogramines B de se fixer au ribosome (26,61). Puisqu'ils ont le même site d'action que l'antimicrobien, la méthylation post-traductionnelle de la cible permet une résistance croisée aux lincosamides et aux streptogramines B ainsi qu'à la tylosine. Certaines bactéries vont aussi devenir résistantes grâce à un mécanisme à efflux ou par protection enzymatique. Les gènes de résistance sont inductibles ou constitutifs et peuvent être situés sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides (16,26,35,60,62).

1.2.4.3 Famille des β -lactamines

Les β -lactamines forment une grande famille contenant des sous-familles distinctes telles que les pénicillines, les céphalosporines, les inhibiteurs de β -lactamases, les carbapénèmes ainsi que les monobactames (Figure 4) (26,33). Plusieurs antimicrobiens de cette famille ont un large spectre d'action contre les bactéries à Gram positif et négatif aérobies et anaérobies. Ils sont encore fréquemment utilisés contre les infections bactériennes pour leur faible toxicité et leur efficacité malgré l'augmentation du nombre de microorganismes résistants (35).

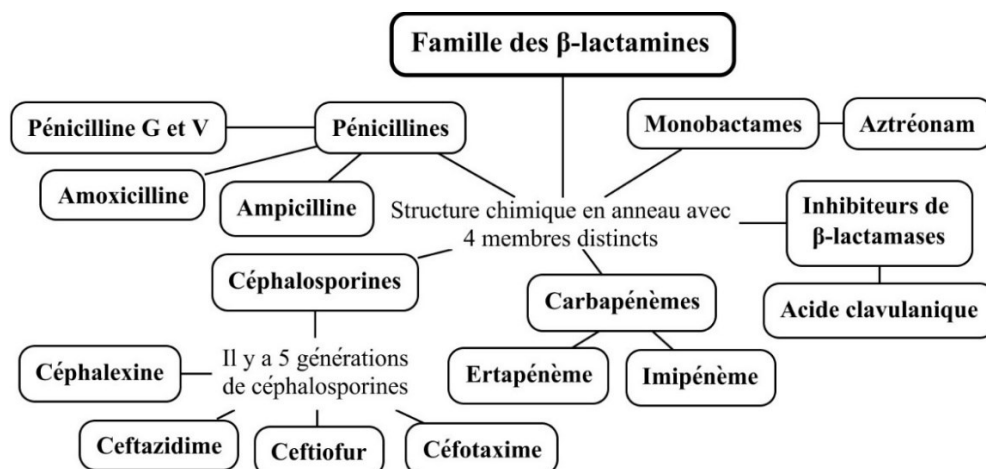


Figure 4. Exemples d'antimicrobiens de la famille des β -lactamines (26).

Depuis les années 1980, il y a une augmentation marquée de résistance à cette famille d'antimicrobiens, mais surtout celle causée par des β -lactamases à large spectre (BLSEs) appartenant aux classes A et D. Celles-ci permettent à la bactérie de résister aux pénicillines et aux céphalosporines, mais pas aux carbapénèmes et aux inhibiteurs de β -lactamase (26). Les différentes classes de β -lactamases sont séparées en enzymes de sérines (Classes A et B) et enzymes de zinc (Classes C et D). La classe A est très diversifiée étant donné les différentes propriétés et conformations de l'enzyme. La classe D possède une séquence en acides aminés très différente des autres classes. Elle est caractérisée par le gène de résistance *bla_{OXA}* (63). La résistance aux β -lactamines est la résistance la plus abondante chez les bacilles à Gram négatif (26). Les gènes de résistance aux β -lactamines codent pour une enzyme BLSEs qui est en mesure de neutraliser la substance antimicrobienne. Ces gènes se retrouvent sur le chromosome et sont généralement constitutifs, mais peuvent aussi se déplacer sur des plasmides conjugatifs ou même des transposons. Le mécanisme inverse a aussi été rapporté, c'est-à-dire que le gène peut s'intégrer dans le chromosome d'un microorganisme, mais il est plutôt rare. En 2012, il y avait

déjà 123 gènes qui menaient à une résistance à cette famille d'antimicrobiens. Les gènes les plus communs codant pour des β -lactamases de classe A sont *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VEB} et *bla*_{GES}. Le gène *bla*_{OXA} est le seul appartenant à la classe D possédant le phénotype BLSEs. Le gène *bla*_{CTX-M} a subi une évolution accélérée et a pris de l'importance depuis le début des années 2000 en prenant progressivement la place des gènes codant pour les enzymes TEM et SHV. Il est d'ailleurs l'un des grands responsables de la résistance clinique développée chez les bactéries *E. coli* causant des infections urinaires. Le gène *bla*_{CTX-M} a été décrit pour la première fois en 1989 et demeure aujourd'hui l'un des principaux gènes responsables de la résistance à large spectre chez les entérobactéries *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) et *Salmonella* spp., mais a aussi été rapporté chez d'autres microorganismes tels que *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) et *Stenotrophomonas maltophilia* (13,26,31,64). Ce gène code pour différents phénotypes dont CTX-M-1 qui est fréquemment en cause lors d'une résistance aux β -lactamines chez les animaux d'élevage. Il a été suggéré que le gène *bla*_{CTX-M} aurait été incorporé dans les plasmides à partir du chromosome bactérien de *Kluyvera* spp., tandis que les autres gènes de résistance proviendraient de mutations des plasmides (13,64,65).

1.2.4.4 Famille des sulfamides

La structure chimique de la famille des sulfamides est caractérisée par la présence d'une fraction sulfamide dérivée de la sulfanilamide, structure analogue de l'acide pABA. Ces antimicrobiens sont majoritairement classés en fonction de leur solubilité avec l'eau et les lipides ainsi que la durée d'action de la substance dans le corps. Les sulfamides sont efficaces contre un grand nombre de bactéries à Gram positif et négatif ainsi que contre certains

protozoaires. Par ailleurs, ils sont généralement inefficaces contre les *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Clostridium* et *Leptospira spp.* ainsi que les rickettsies et les mycoplasmes (26). Les sulfamides ont un large spectre d'action, mais ils ont été antérieurement moins utilisés dû à des effets secondaires de plus en plus fréquents tels que la résistance, les allergies, le syndrome de Stevens-Johnson et la dyscrasie sanguine. L'intérêt pour ces antimicrobiens a augmenté depuis quelques années grâce à la combinaison synergique du sulfaméthoxazole et le triméthoprine, un composé appartenant à la famille des diaminopyrimidines (26,35).

La résistance aux sulfamides est médiée par les gènes *sul1*, *sul2*, *sul3* qui codent pour des enzymes DHPS modifiées. Ainsi, la synthèse de l'acide folique peut être complétée. Ces gènes de résistances sont situés sur des plasmides bactériens (49). Les gènes de résistances aux sulfamides ont surtout été retrouvés chez des souches de *Salmonella* et de *E. coli*. Le gène *sul1* est porté par un plasmide conjugatif et est lié à un intégron de classe I. Le gène *sul2* n'est pas porté par des plasmides conjugatifs, mais se retrouve sur des plasmides souvent multi-résistants. Pour sa part, le gène *sul3* a été associé à *Salmonella* Typhimurium, un sérotype qui portait aussi les gènes *sul1* et *sul2*. Le gène *sul3* est généralement associé aux intégrons de classe 1 ainsi qu'aux gènes *aadA* et *dfrA*, ce qui permet une résistance à deux antimicrobiens souvent utilisés ensemble pour traiter les infections, le sulfaméthoxazole et le triméthoprine (48). La résistance aux sulfamides chez les bactéries à Gram négatif a été souvent associée à la résistance aux tétracyclines et à l'ampicilline, une pénicilline à large spectre (26).

1.2.4.5 Famille des glycopeptides

La vancomycine est le principal antimicrobien de la famille des glycopeptides. Les glycopeptides sont efficaces contre un grand nombre de bactéries à Gram positif, mais sont inefficaces contre celles à Gram négatif étant donné l'absence d'une paroi cellulaire. Ces antimicrobiens sont très peu utilisés en premier recours étant donné l'utilisation des β -lactamines, mais sont davantage utilisés lorsque celles-ci ne sont plus efficaces contre les infections causées par des microorganismes résistants. Ils sont davantage administrés pour traiter les infections multirésistantes telles que celles causées par la bactérie *S. aureus* résistante à la méticilline (SARM) (26,50).

Comme les tétracyclines, les macrolides et les β -lactamines, la famille des glycopeptides contient aussi des GRAs à large spectre (19). La résistance à la vancomycine est causée principalement par les gènes *van*(A, B) qui forment des récepteurs de peptidoglycanes ayant une affinité plus faible pour les glycopeptides. Des précurseurs de peptidoglycanes tels que le D-alanine-D-sérine et le D-alanine-D-lactate ont été retrouvés chez des bactéries résistantes en plus du précurseur habituel D-alanine-D-alanine. C'est l'un des problèmes de résistance les plus importants en santé publique puisque la vancomycine est généralement utilisée lors d'apparition de résistance aux pénicillines. La résistance à la vancomycine a été retrouvé chez plusieurs cocci à Gram positif. (26,50).

1.2.4.6 Famille des aminoglycosides

Les aminoglycosides ne sont pas efficaces contre certaines bactéries anaérobies. Ces antimicrobiens peuvent être utilisés en synergie avec les pénicillines et les céphalosporines, ce qui perturbe davantage l'homéostasie des bactéries et mène à la mort cellulaire (26,35). Cette famille inclut des antimicrobiens tels que la streptomycine, la gentamycine, la tobramycine et l'amykacine. Ils sont efficaces contre les bactéries à Gram négatif et certaines à Gram positif. Cette famille se caractérise par son groupe aminocyclitol dans sa structure chimique et est divisée en trois classes : les aminoglycosides à spectre étroit, les aminoglycosides à spectre large ainsi que les miscellaneus (Figure 5) (26).

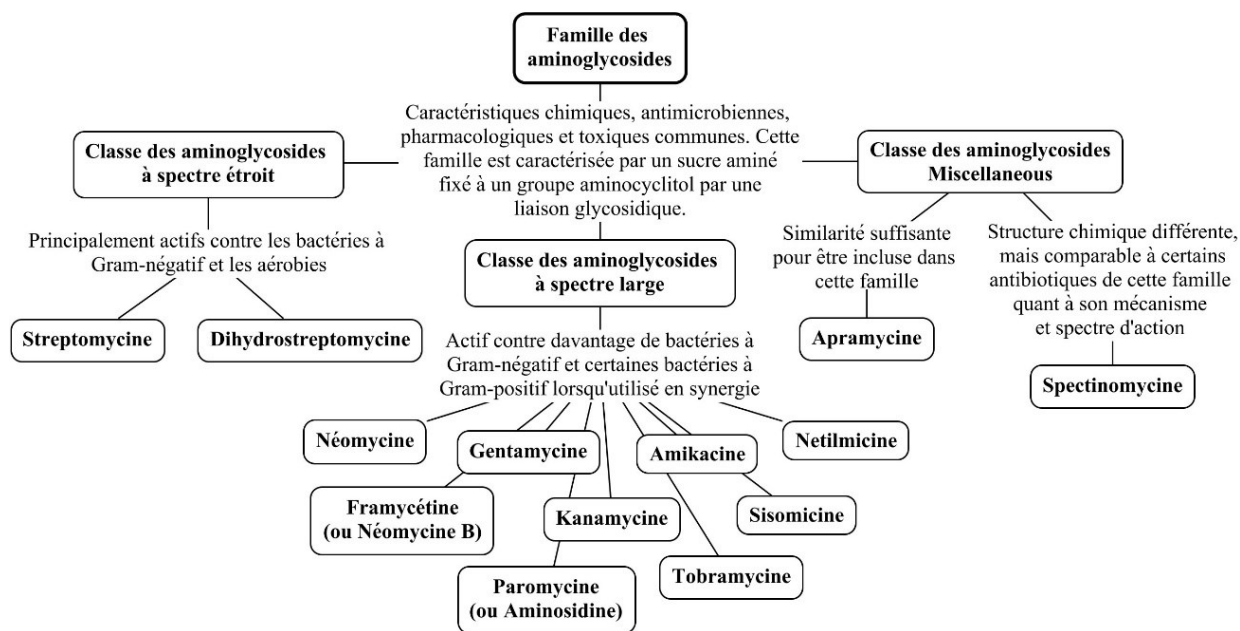


Figure 5. Exemples d'antimicrobiens de la famille des aminoglycosides (26).

Chez certaines bactéries, l'altération du transport de l'antimicrobien leur permet de devenir résistantes, tel qu'il a été noté chez des souches de *P. aeruginosa* qui sont résistantes à la streptomycine. Il existe aussi des mécanismes de protection ribosomique qui peuvent être causées par des mutations modifiant les sites de liaison de l'antimicrobien sur le ribosome. Chez *E. coli* et *P. aeruginosa*, il a été noté qu'une seule mutation permettrait de devenir résistante à la streptomycine (26). Plus de 50 enzymes seraient responsables d'une résistance par un mécanisme de protection enzymatique permettant l'inactivation de l'antimicrobien, dont des acétyltransférases, des nucléotidyltransférases et des phosphotransférases. Ce mécanisme de résistance a été retrouvé chez des souches de *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Streptococcus pneumoniae*. Ces enzymes modifiées réduisent l'affinité de la molécule antimicrobienne avec son site de liaison à la sous-unité 30S du ribosome. En plus, ce mécanisme de protection enzymatique permet aussi la résistance aux fluoroquinolones (26,33).

1.2.4.7 Famille des quinolones

Les quinolones forment une famille d'antimicrobiens synthétiques dérivés de l'acide quinolone carboxylique. Ils sont actifs contre un grand nombre de bactéries à Gram négatif et positif, les pathogènes intracellulaires tel que *Brucella spp.*, les Mycoplasmes, les *Chlamydia spp.* La famille contient plusieurs classes distinctes divisées en fonction de leur génération, de leur spectre d'action et de la présence d'un groupe fluor, formant ainsi la classe des fluoroquinolones (Figure 6). Ces antimicrobiens sont en fait dérivés de différentes structures chimiques en forme d'anneau (26,35,66).

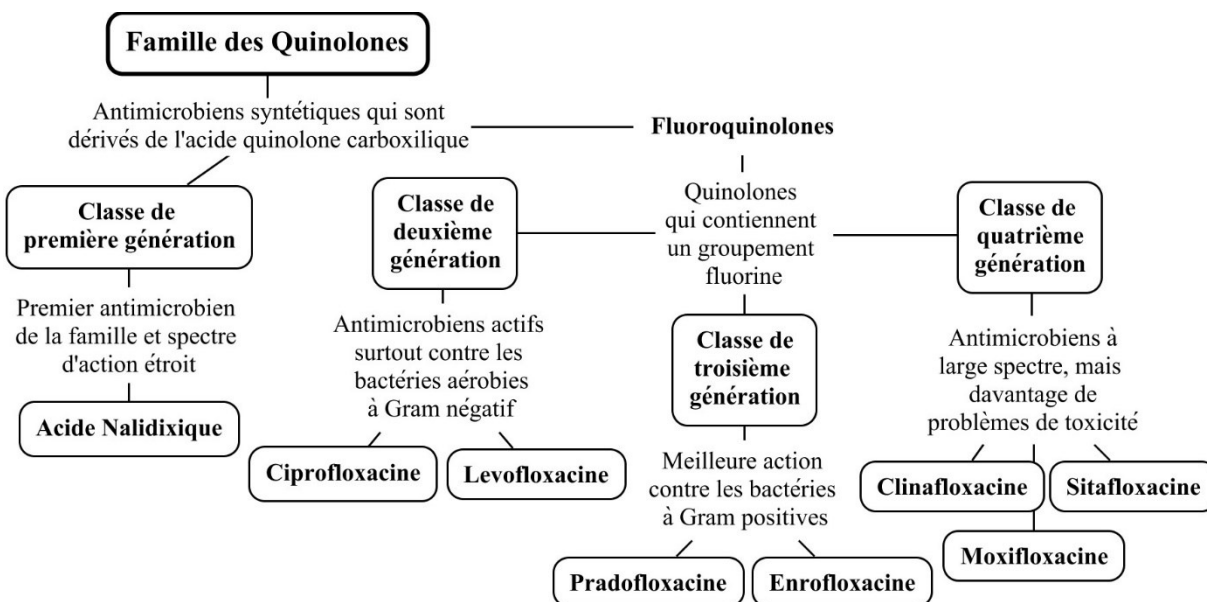


Figure 6. Exemples d'antimicrobiens de la famille des quinolones (26,35,66).

La résistance chez les bactéries à Gram-négatif résulte d'une modification de la sous-unité A de l'ADN gyrase ou, plus rarement, d'une modification de la sous-unité B. Chez les bactéries à Gram-positif, il y a généralement modification de la topoisomérase IV suivie par un changement de l'ADN gyrase. Des mutations chromosomiques ont été rarement observées et les gènes de résistance n'ont pas été retrouvés à ce jour sur des éléments mobiles génétiques (26,35).

1.2.4.8 Famille des polymyxines

Les polymyxines sont une petite famille de cinq composés chimiques : les polymyxines A à E. Les polymyxines B et les polymyxines E (colistine) sont les seules disponibles sur le marché (27). La colistine est efficace contre les entérobactéries à Gram négatif multirésistantes,

mais dû à ses effets très néphrotoxiques, elle est utilisée comme antimicrobien de dernier recours en médecine humaine lorsque des antimicrobiens tels que les carbapénèmes ne sont pas efficaces. Elle peut aussi remplacer certains antimicrobiens de la famille des aminoglycosides tels que les streptomycines et les gentamycines. Il y a deux formes de colistine qui peuvent être utilisées : le sulfate de colistine et le colistiméthate sodique (56). En médecine vétérinaire, il n'y a que le sulfate de colistine qui est autorisée dans certains pays pour le contrôle des infections causées par des entérobactéries ou pour être utilisé comme promoteur de croissance chez les porcs (34).

La résistance à la colistine chez les entérobactéries est causée par l'ajout du phosphoéthanolamine et/ou le 4-amino-4-désoxy-L-arabiose sur la sous-unité du lipide A, résultant en une modification structurale du site de fixation de l'antimicrobien sur le LPS. Cette modification entraîne donc une diminution de l'interaction électrostatique entre la colistine et le LPS (34). La résistance à la colistine n'est pas récente, car plusieurs bactéries, telle que *Salmonella* Typhimurium, possèdent les gènes de résistance non constitutifs *pmrA* et *pmrB* (67). Cependant, la résistance à la colistine a été détectée pour la première fois sur un plasmide conjugatif en Chine entre 2011 et 2014 lors d'une étude de surveillance de la résistance aux antimicrobiens (54). Le gène *mcr-1* a été retrouvé chez la bactérie commensale *E. coli*. En fait, la prévalence du gène s'est avérée respectivement de 14,1% et 20,6% chez des isolats de *E. coli* dans la viande crue et chez les porcs. Plus tard, le gène a aussi été détecté chez des souches de salmonelle et *K. pneumoniae* d'origines alimentaires, animales et humaine (27,30). Au Canada, le gène *mcr-1* a été détecté chez trois isolats d'*E. coli* multirésistants (30). Dans une étude publiée en 2016, une équipe de recherche a rapporté la découverte du gène *mcr-2* chez des

souches d'*E. coli* résistantes à la colistine isolées chez des échantillons fécaux de veaux et des porcelets qui ne contenaient pas le gène *mcr-1* (55).

1.3 La résistance aux antimicrobiens en élevage

Les MRAs sont présents dans le microbiote des animaux d'élevage depuis déjà plusieurs années (6). Les bactéries *E. coli*, *Salmonella* et *Campylobacter* spp. sont fréquemment porteuses d'une résistance aux antimicrobiens et peuvent être responsables d'infections chez les animaux. Elles font partie du programme de surveillance de l'ASPC (30). Des métaux tels que le zinc et le cuivre peuvent être ajoutés dans la ration alimentaire des porcs pour promouvoir la croissance et contrôler les infections. Les macrolides, les tétracyclines, les lincosamides, les ionophores, les flavophospholipols, les polypeptides ainsi que les streptogramines sont toutes des familles d'antimicrobiens pouvant être utilisés comme facteur de croissance au Canada (4,68). Tel qu'il a été mentionné, l'utilisation conjointe de métaux et d'antimicrobiens engendre une co-sélection pour des GRAs dans le microbiote intestinal des animaux (11). Plusieurs types d'élevages peuvent avoir recours aux antimicrobiens, mais ce document traite de l'élevage des porcs.

1.3.1 Les antimicrobiens utilisés en production porcine

Chez les porcs, les antimicrobiens sont utilisés pour le traitement des infections, mais aussi en prophylaxie pour la prévention des infections. Ils peuvent aussi être utilisés comme facteurs de croissance avec des doses sous-thérapeutiques afin de promouvoir l'assimilation des nutriments et un meilleur apport en énergie (3). Aux États-Unis et au Canada, plus de la moitié

des antimicrobiens produits sont utilisés à des fins d'élevage des animaux. Le mélange d'antimicrobien ASP250 est utilisé comme facteur de croissance ou pour le traitement d'infections entériques aux États-Unis en production porcine. Il contient la chlorotétracycline, la sulfaméthazine et la pénicilline (6). Selon les données de surveillance présentées en 2014 du Programme Intégré Canadien de surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens (PICRA), les classes d'antimicrobiens les plus utilisés chez les porcs en croissance-finition sont, les tétracyclines, les macrolides et les lincosamides. Ensuite, suivent les ionophores, les flavophospholipides, les pleuromutilines, les sulfamides, les pénicillines puis les streptogramines (30). La tylosine ainsi que la sulfadiazine sont utilisées chez les jeunes porcs en prophylaxie et pour le traitement des diarrhées (22,62). La colistine sulfate est un antimicrobien autorisé en médecine vétérinaire pour l'élevage des porcs dans plusieurs pays tels que la Chine et le Japon, mais n'est pas approuvée au Canada et aux États-Unis ainsi que tous ceux faisant partie de l'Union Européenne (27).

Un résumé des antimicrobiens utilisés pour traiter les infections en production porcine se retrouve dans le tableau III.

Tableau III. Antimicrobiens pouvant être utilisés pour le traitement des infections bactériennes aux États-Unis et au Canada en production porcine.

Antimicrobien	Famille	Classification selon Santé Canada	Références
Enrofloxacin	Quinolones (Fluoroquinolone)	I	(3,30)
Ceftiofur	β -lactamines (Céphalosporines)	I	(3,30)
Colistine	Polymyxines	I	(34)
Tylosine	Macrolides	II	(61,62)
Pénicilline	β -lactamines	II	(69)
Néomycine	Aminosides	III	(69)
Chlortétracycline	Tétracyclines	III	(3,69)
Oxytétracycline	Tétracyclines	III	(3,69)
Sulfaméthazine	Sulfamides	III	(6,22)
Salinomycine	Ionophores	IV	(3)
Bambermycine	Flavophospholipols	IV	(3)

1.3.2 Profils de résistance chez les porcs

L'utilisation des antimicrobiens a eu des impacts significatifs sur l'émergence de différents MRAs. Par exemple, de nombreuses souches bactériennes résistantes aux tétracyclines sont apparues au début des années 2000 suite à leur utilisation comme facteurs de croissance chez les porcs (8). Selon le rapport du Système Canadien de Surveillance de la Résistance aux Antimicrobiens produit par l'ASPC en 2016, les bactéries *E. coli* isolées dans les fermes porcines, à l'abattoir et dans la viande au détail ont généralement présenté des profils de résistance à la tétracycline, la ceftriaxone, la gentamicine et l'acide nalidixique. Les bactéries *Campylobacter* isolées à l'abattoir ont été principalement trouvées résistantes à la tétracycline,

l'azithromycine et la télithromycine. Certains isolats étaient aussi résistants à la ciprofloxacine. À ce jour, il n'y a pas de surveillance de *Campylobacter* à la ferme et dans la viande au détail. La salmonelle est aussi porteuse de résistance aux antimicrobiens. En effet, *Salmonella* spp. est surveillée dans les fermes porcines et à l'abattoir, mais ne l'est pas systématiquement dans la viande au détail. Parmi les données disponibles, ces bactéries étaient résistantes à la tétracycline, le sulfisoxazole, la streptomycine et l'ampicilline. Fait important, 44% des isolats recueillis étaient multirésistants (30).

Selon l'étude de Juntunen et *al.* (2010), la résistance aux macrolides a été observée comme étant plus élevée chez les jeunes porcs que ceux en croissance-finition (62). En fait, l'usage de la tylosine chez les porcs peut permettre l'émergence de souches porteuses de gènes *erm* grâce à la pression de sélection exercée. Comme il a déjà été mentionné précédemment, les gènes *erm* permettent la résistance aux MLS_B ainsi qu'à un large éventail d'antimicrobiens appartenant à la famille des macrolides (61). Zhou et *al.* (2009) ont rapporté une prévalence élevée de résistance aux MLS_B chez des porcs pour lesquels les antimicrobiens n'avaient pas été utilisés (38). Il a aussi été rapporté que l'usage des macrolides ou des tétracyclines peut mener à une co-sélection favorisant l'acquisition de gènes de résistance *erm*(B) ou *tet*(M) (60). Plus tard, des chercheurs ont obtenu une faible corrélation entre la distribution des gènes *erm* et les gènes de résistance aux tétracyclines, suggérant que leurs disséminations dans l'environnement ne serait pas liées (61). Les excréments de porcs peuvent contenir de nombreux GRAs. Parmi ceux rapportés, notons *sul1*, *sul2* et *sul3*, *sulA*, *qnr*(A et S) ainsi que *tet*(A, B, E et O) (21,22,70).

1.4 L'environnement comme réservoir de GRAs

1.4.1 Réservoir naturel de ces gènes

L'environnement contient naturellement des MRAs. L'étude approfondie de la séquence d'ADN des GRAs indique que les agents pathogènes d'origine clinique contiennent des gènes provenant de microorganismes de l'environnement (24). Cependant, les mécanismes menant au transfert environnemental et qui expliquent leur dispersion ne sont pas très documentés à ce jour (71). Des antimicrobiens, tels que la pénicilline et la gramicidine, ont été découverts chez des microorganismes naturellement résistants dans l'environnement (15). *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* sont des exemples de bactéries qui possèdent naturellement des GRAs. Par ailleurs, de tels gènes ont été très souvent trouvés chez des bactéries pathogènes pour les humains faisant partie des genres *Escherichia*, *Pseudomonas* et *Klebsiella*. Ce sont d'ailleurs aussi des bactéries indigènes du sol (72). Le progéniteur du gène chromosomique *bla*_{CTX-M} est *Kluyvera* spp, mais ce gène est plutôt retrouvé sur des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides et les transposons puisqu'il s'agit de résistance acquise. Il y a un réservoir environnemental naturel des gènes de résistance aux β -lactamines (13). D'autres études ont aussi révélé qu'il y a des GRAs dans le pergélisol et des grottes très profondes, ce qui renforce le fait que le phénomène de résistance est omniprésent dans l'environnement et qu'il serait antérieur aux effets anthropiques (24). N'importe quel environnement peut ainsi être considéré comme étant un réservoir potentiel de GRAs. Ainsi, il est important de distinguer la présence des microorganismes indigènes résistants aux antimicrobiens de ceux qui le deviennent suite à l'activité humaine, tel que l'ajout d'effluents d'élevage qui contiennent des antimicrobiens, des MRAs et des GRAs (18). Il est possible de distinguer l'impact des effets anthropiques sur la

présence des GRAs dans l'environnement en comparant les données recueillies avec celles des zones environnementales n'ayant pas subi (ou presque) ses effets, servant ainsi de contrôles. Ces parcelles contrôles peuvent être intégrées dans les études afin d'observer les impacts des traitements étudiés. Aussi, il est important de noter que la résistance présente dans l'environnement n'est pas toujours la même que celle observée dans les milieux hospitaliers. En effet, les souches bactériennes ainsi que les types et l'emplacement des gènes de résistance concernés (chromosome, transposon, plasmide) peuvent être différents (1).

1.4.2 La résistance aux agents antimicrobiens liée aux pratiques d'épandage d'engrais de ferme

Comme les antimicrobiens sont utilisés en quantités importantes dans l'élevage des animaux, l'épandage de fumiers comme engrais organique peut permettre l'introduction de GRAs dans l'environnement, comme dans le sol, les végétaux, l'eau de drainage et l'eau de surface (24,73). La dissémination et la propagation des GRAs à travers le monde suggèrent que l'environnement joue un rôle crucial en tant que réservoir de GRAs pour les microorganismes pathogènes pour l'humain (13). Il est connu que le lisier de porc contient des antimicrobiens, des métabolites ainsi que des MRAs. Par ailleurs, il y a encore très peu d'études qui se sont penchées sur la présence de GRAs dans le sol cultivé ainsi que dans l'eau de drainage. Il a toutefois été rapporté qu'il y avait davantage de GRAs dans le sol suite à l'épandage de fumiers (2,10,16,22,24).

Dans ce document, il y a mention d'impact transitoire, à court-terme, à moyen terme et à long-terme des épandages de lisier de porc sur la présence des GRAs dans le sol. Un impact transitoire correspond à un impact de quelques jours seulement après l'épandage, un impact à court terme est un impact de plusieurs semaines, un impact à moyen-terme fait référence à plusieurs mois tandis qu'un impact à long-terme est un impact observé pendant plus d'une saison de culture correspondant à un an au Québec.

1.4.2.1 Abondance des GRAs dans le sol suivant les épandages de lisier de porc

Une étude a été réalisée par Marti et *al.* (2013) avec des cultures du Sud-Est de l'Ontario afin d'évaluer la persistance dans le sol de GRAs et leur présence dans les légumes à travers deux saisons de culture. Le sol fertilisé au lisier de porc présentait généralement autant de GRAs que dans le sol fertilisé avec des engrais minéraux. Parmi les gènes qui ont été détectés, *erm*(A) et *erm*(F) sont les seuls dont la quantité était significativement plus élevée dans le sol ayant reçu du lisier de porc. Les chercheurs ont aussi détecté des GRAs dans les légumes cultivés sur ces sols. Beaucoup de gènes ont été détectés dans ces végétaux cultivés sur un sol non fertilisé au lisier de porc, ce qui démontre un réservoir déjà existant de GRAs dans les légumes. Ceux qui ont été cultivés sur des terres fertilisées au lisier de porc contenaient des gènes en plus tels que *sul2*, *tet*(T), *erm*(F), *bla*_{OXA-20} et *qnr*(A) (24).

Marti et al. (2014) ont rapporté une quantité supérieure de gènes *erm*(B), *sul1*, *str*(B) ainsi que *int1* a été trouvé dans les sols fertilisés avec du lisier de porc comparé à ceux fertilisés avec des engrais inorganiques servant de contrôles. Le gène *int1* a été détecté et quantifié dans

les parcelles contrôles durant toute la durée de l'étude, mais a tout de même obtenu des abondances relatives (nombre de copies de gènes *int1* / nombre total de gènes *rrnS* représentant le nombre de bactéries totales) beaucoup plus grandes dans les sols fertilisés avec du fumier de bovin ou du lisier de porc. Cette étude a montré qu'un délai supérieur à une saison de culture (4 mois) est nécessaire afin de permettre la diminution des GRAs dans le sol à des abondances similaires à celles des sols n'ayant pas reçu de fumiers (2).

Garder et *al.* (2014) ont réalisé une étude sur le transport et la persistance des gènes de résistance aux MLS_B dans le sol et l'eau de drainage suivant l'épandage de lisier de porc sur de grandes cultures en rotation de soya et de maïs situées sur un site expérimental du Nord-est de l'Iowa, aux États-Unis. Leurs résultats ont montré une augmentation de gènes *erm*(B) et *erm*(F) dans le sol suite à l'épandage du lisier de porc, mais leur concentration a diminué jusqu'à atteindre en douze mois des niveaux équivalents à ceux observés dans les parcelles contrôles n'ayant pas reçu de lisier de porc (16).

En Allemagne, Heuer et Smalla (2007) ont observé une augmentation de gènes de résistance aux sulfamides *sul1* et *sul2* après avoir épandu du lisier de porcs élevés sans antimicrobiens. L'épandage du lisier avec ajout de 160 mL sulfadiazine (5 g/L) a eu un effet pendant plus de 2 mois sur l'augmentation de l'abondance des gènes *sul1*. Le gène *sul3* n'a pas été détecté dans leurs échantillons de lisier et de sol. Cette étude a été réalisée sur deux types de sol différents : un loam limoneux qui ne recevait pas de fumiers et un sable argileux qui en recevait périodiquement. Il a été rapporté que le sol recevant des fumiers avait déjà de fortes

concentrations en gènes *sul1*, ce qui est dû probablement à une accumulation de résistance à travers le temps selon les auteurs. De plus, bien que leurs parcelles « contrôles » et celles recevant du lisier de porc n'avaient pas les mêmes types de sol, les tendances observées en quantités de gènes de résistances *sul1* et *sul2* pour les sols recevant du lisier de porc avec ajout de sulfadiazine (5 g/L) ont été les mêmes pour les deux types de sol, c'est-à-dire que la plus grande quantité de gènes a été détecté après 32 jours suivant l'épandage. Cette équipe n'a pas détecté de gènes *int1* dans le sol non fertilisé alors qu'il y en avait dans le sol recevant du lisier (22,70).

Une autre étude réalisée en France avait pour objectif d'étudier les réservoirs potentiels de souches d'*E. coli* produisant des BLSEs provenant d'échantillons de sols, de bovins et de l'environnement agricole. Les gènes *bla_{CTX-M}* ont été détectés dans 20% des extraits d'ADN d'isolats d'*E. coli*. Cette étude a permis aux chercheurs de détecter les gènes *bla_{CTX-M-1}* ou 9 et *bla_{TEM-71}* dans le sol de 12 fermes de cultures différentes recevant des fertilisants organiques. Le gène *bla_{SHV}* n'a été détecté dans aucun échantillon de sol. En somme, cette étude suggère que la résistance aux bêta-lactamines peut être causée par d'autres gènes que ceux-ci et/ou par d'autres microorganismes qu'*E. coli* dans le sol. Les auteurs ont aussi rappelé l'importance d'étudier le réservoir environnemental des souches productrices de BLSEs puisqu'elles pourraient éventuellement expliquer leur survie à long terme dans un sol qui a été fertilisé quelques mois auparavant (13).

Récemment en Chine, une étude a comparé l'effet des cultures sur l'abondance des GRAs dans le sol recevant des fumiers depuis au moins 3 ans. Les gènes *int1*, *tet*(A, Ap, BP, C, G, L, M, O, W et X) ainsi que *sul1* et *sul2* ont été détectés dans tous les échantillons de sol. Par ailleurs, une plus faible quantité des gènes *sul1*, *tet*(A, C, G et M) a été trouvée dans les échantillons de sol provenant de terres cultivées en laitue ou endives. L'étude a montré que les cultures ont un effet sur la répartition des GRAs dans les sols fertilisés à l'aide des fumiers (20). Selon une autre étude réalisée en Chine, les gènes *sul1*, *sul2* et *sul3*, *sulA*, *qnr*(A et S), *tet*(A, B, E et O) ont été détectés dans des échantillons de sol ayant reçu du lisier de porc. Les gènes *sul1* et *tet*(O) se sont avérés être les plus abondants parmi tous les GRAs analysés dans les échantillons de sol (21).

Certaines études n'ont pas vu d'effet de l'épandage de fumiers à des doses agronomiques sur l'augmentation d'abondance de MRAs à long terme dans le sol (74–77). Une augmentation de GRAs à court terme a tout de même été observée (75,76). Zhou et *al.* (2010) ont observé une augmentation transitoire de résistance aux MLS_B chez des microorganismes du sol ayant reçu du lisier de porc élevé avec ou sans antimicrobiens. Ils ont tout de même souligné le fait que des résultats différents auraient pu être observés pour d'autres antimicrobiens ou s'ils avaient étudié la distribution des gènes de résistance aux MLS_B (77).

Une étude publiée en 2010 a rapporté une augmentation de la résistance antimicrobienne dans différents types de sol des Pays-Bas échantillonnés entre les années 1940 et 2008. Les chercheurs ont pu observer une augmentation de l'abondance relative de 78% des GRAs à

travers le temps, dont 31% avaient significativement augmenté. Les gènes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *erm*(B, C, E et F), *tet*(B, L, M, O, Q et W) ainsi que *vanB* ont été quantifiés dans tous les échantillons de sol ayant déjà reçu des engrais organiques au cours des années. Les sols n'ayant reçu que des engrais minéraux contenaient les gènes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *erm*(B, C, E et F) ainsi que *tet*(M, O, Q et W). Les gènes ayant eu la plus grande augmentation d'abondance sont *tet*(M, O et Q) ainsi que *bla*_{TEM}. Plusieurs facteurs associés au type de sol peuvent expliquer les résultats obtenus, tels que les niveaux de métaux lourds, les caractéristiques de drainage, les méthodes de fertilisation ainsi que les pratiques d'irrigation (19).

Un délai minimum de 90 à 120 jours est recommandé entre l'épandage et la récolte afin d'assurer que les quantités de microorganismes pathogènes soient à des niveaux acceptables face au risque pour la santé (2,78). Certains chercheurs se sont demandé si ces recommandations pouvaient aussi assurer une diminution suffisante de GRAs dans le sol, des gènes qui ont été ajoutés ou stimulés par l'épandage de fumiers. C'est le cas de Marti et *al.* (2014) qui ont constaté une abondance relative (nombre de copies de gènes / nombre total de gènes *rrnS*) supérieure de gènes *sul1* et *int1* au moins 4 mois suivant l'épandage comparé aux parcelles contrôles (2). Heuer et Smalla (2007) ont pour leur part remarqué cette abondance plus élevée pendant 61 jours suivant l'épandage (22).

1.4.2.2 Influence du travail du sol sur le transport des GRAs

Très peu d'études ont documenté l'impact du travail du sol sur le transport des MRAs dans l'environnement suivant les épandages de fumiers. Bien que plusieurs hypothèses aient été émises concernant la propagation des GRAs dans l'environnement, le travail du sol pourrait contribuer au transport de ces gènes dans l'eau de drainage et les bassins versants agricoles. Garder et *al.* (2014) ont évalué l'effet du travail du sol sur le transport des entérocoques résistants à la tylosine. Les résultats obtenus n'ont pas démontré que le labour du sol et l'épandage du lisier de porc avait un effet significatif sur le transport des gènes *erm*(B) et *erm*(F) dans l'eau de drainage. Aussi, il a été rapporté que la diversité des microorganismes du sol en surface est plus grande lors d'un travail réduit comparé au travail conventionnel du sol (79). Le transport des microorganismes vers les drains agricoles peut être influencé par un travail réduit ou nul du sol résultant du mouvement accru de l'eau dans les macropores (80). Stoddard et *al.* (1998) n'ont pas observé d'impact significatif du transport des microorganismes indicateurs de contamination fécal à travers le sol en fonction du type de travail du sol ou du moment de l'épandage des fumiers (81).

1.5 Méthodes de détection de la résistance aux antimicrobiens

1.5.1 Méthodes de microbiologie

Les méthodes de détection de la résistance aux antimicrobiens à l'aide des cultures bactériennes impliquent généralement l'isolement et la croissance de bactéries ciblées sur des milieux de cultures en fonction de leur réponse à différentes concentrations d'antimicrobiens connues (antibiogrammes). Ces méthodes permettent d'étudier la réponse d'un isolat à des antimicrobiens par le biais de l'expression de GRAs. Elles ne permettent pas l'identification des gènes de résistance. L'isolement de bactéries permet de connaître le phénotype de résistance ainsi que le lien entre les bactéries résistantes environnementales et celles d'origine clinique. Parmi les désavantages de ces méthodes, notons les taux entre 50 et 75% de croissance de bactérie non spécifiques entre autres lors d'un isolement réalisé à partir d'échantillons environnementaux. Ainsi, des étapes supplémentaires de confirmation de la bactérie sont donc nécessaires avant de procéder aux tests de résistance aux antimicrobiens. La confirmation peut se faire à partir de tests de réactions enzymatiques (ex. expression de l'enzyme uréase ou la réduction du fer). Il est aussi possible de confirmer l'identité d'une bactérie par des méthodes de biologie moléculaire (ex. PCR qui cible une région de l'ARNr 16S) (82).

1.5.2 Méthodes de biologie moléculaire

Afin de détecter les GRAs, il est possible de rechercher des molécules telles que des protéines de synthèse ou des molécules responsables de la résistance, mais elles représentent uniquement les gènes qui ont été exprimés (72). À partir d'un extrait d'ADN total, la détection des gènes peut aussi être réalisées par une méthode de PCR qui permet de retrouver tous les

gènes d'intérêts présents dans les échantillons, qu'ils soient exprimés ou non. Les échantillons environnementaux peuvent contenir divers inhibiteurs de polymérase dans les extraits d'ADN tels que l'urée, les phénols, l'éthanol, les polysaccharides, les sels biliaires, le dodécylsulfate de sodium (SDS), l'acide humique, l'acide tannique, l'acide fulminique, l'acide fulvique, les calciums, les métaux lourds, les ribonucléases et les protéines. Ces inhibiteurs varient selon la source de l'échantillon et peuvent agir à de faibles concentrations, ce qui peut ainsi réduire la sensibilité de la méthode et mener à des faux négatifs. L'élimination des inhibiteurs peut aussi représenter un défi lorsque les gènes sont quantifiés par qPCR puisqu'ils peuvent entraîner des résultats de quantités de gènes plus faibles que ce dont l'échantillon contient réellement (83).

1.5.3 Microorganismes indicateurs de contamination fécale

Les bactéries intestinales peuvent être des indicateurs de contamination fécale puisqu'elles se retrouvent dans les excréments d'animaux et dans l'environnement. Lorsqu'une contamination fécale est suspectée, des indicateurs sont utilisés afin de valider ou non la présence de matière d'origine fécale. La détection de ces bactéries permet de vérifier la qualité de l'eau puisqu'elles peuvent permettre de connaître les probabilités d'une contamination par des microorganismes pathogènes. Généralement, afin d'être un bon indicateur de contamination fécale, le microorganisme choisi ne devrait pas se multiplier dans l'environnement et devrait être facile à isoler, dénombrer et identifier en laboratoire (84). Les bactéries *E. coli* et entérocoques sont des indicateurs fréquemment utilisés pour vérifier la qualité de l'eau (17). Ce sont d'importants microorganismes commensaux qui ont été largement étudiés dans des cas de résistance antimicrobienne. Aussi, ce sont des bactéries qui persistent généralement bien dans

l'environnement et certaines souches sont pathogènes pour les humains et les animaux. La population des entérocoques dans le sol peut rester constante jusqu'à 80 jours suivant l'épandage du lisier de porc tandis que celle d'*E. coli* tombe sous les limites de détection. Les entérocoques sont généralement plus persistants qu'*E. coli*, sauf en présence d'un sol sablonneux (17). La présence de *K. pneumoniae* est aussi de plus en plus vérifiée puisqu'il s'agit d'une bactérie qui est aussi présente dans l'intestin des animaux. Selon les informations disponibles, les bactéries indicatrices de contamination fécale sont plus fréquemment porteuses de GRAs. Ils jouent donc un rôle important dans la propagation des GRAs entre les différents environnements de la biosphère microbienne (1,18).

2. HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

La revue de littérature précédente a permis de constater la nécessité de poursuivre les études sur la résistance aux antimicrobiens dans l'environnement qui n'est pas suffisamment détaillée à ce jour. De plus, le rôle des pratiques agricoles a été peu documentée concernant les épandages de lisier de porc à différentes doses, mais encore moins concernant les différentes méthodes de travail du sol qui peuvent influencer la présence des GRAs dans l'environnement. D'autres recherches doivent encore être réalisées afin de bien comprendre les facteurs impliqués dans la dissémination et la propagation des MRAs à travers le monde. La revue de littérature précédente m'a mené à poser les deux hypothèses suivantes :

- 1) Les épandages répétés de lisier de porc augmentent la quantité de GRAs dans le sol.
- 2) Le transport des MRAs dans l'environnement est influencé par le mode de travail du sol.

Les objectifs du projet étaient, en premier lieu, de déterminer l'impact d'épandages répétés de lisier de porc sur la présence de microorganismes résistants aux antimicrobiens dans le sol, et en second lieu, de préciser l'effet du travail du sol sur le transport des GRAs dans l'eau de drainage.

3. ARTICLE SCIENTIFIQUE

En préparation pour la revue Applied and Environmental Microbiology (AEM)

IMPACT OF LIQUID HOG MANURE APPLICATIONS ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE GENES ABUNDANCE IN SOIL AND DRAINAGE WATER IN FIELD CROPS

Elodie Larouche ^{a,b}, Mylène Généreux ^a, Marie-Ève Tremblay ^a, Mohamed Rhouma ^b, Marc-Olivier Gasser ^a, Sylvain Quessy ^b, Caroline Côté ^a

^aResearch and Development Institute for the Agri-environment (IRDA), Quebec, Canada

^bDepartment of Pathology and Microbiology, Faculty of veterinary medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Running title: Antimicrobial resistant genes from agricultural soil and drainage water

Address correspondence to   lodie Larouche (elodie.larouche@umontreal.ca)

Abstract

Antimicrobial resistance is a global public health threat. Agricultural practices such as manure applications could contribute to the spread of antimicrobial resistance genes (ARGs) in the environment. The objective of the present study was to assess the impact of hog manure application (0, 20 and 45 m³/ha) and tillage practices (reduced or conventional) on the presence of ARGs in soil and drainage water under wheat crops. Liquid hog manure, soil and drainage water were sampled. *Escherichia coli* (*E. coli*) and enterococci populations have been determined. After genomic DNA extraction, *tet*(T), *sul1*, and *bla*_{CTX-M-1} resistance genes were quantified using a quantitative PCR. The detection of *mcr-1* and *mcr-2* genes was conducted using a conventional PCR. Results showed that high dose of manure (45 m³/ha) increased the amount of *tet*(T) and *sul1* genes for more than 116 days after application, suggesting that this delay was not enough for abundance to return to background levels. The gene abundance in soil with manure dose (20 m³/ha) has returned to background levels. The *tet*(T) gene abundance in water decreased significantly from November 4th ($p < 0.0004$) while *sul1* abundance decreased significantly from June 13th ($p < 0.0053$). Tillage practices had no impact on ARGs abundance in soil and water samples ($p > 0.0770$). *bla*_{CTX-M-1} genes were detected in manure and in seven water samples, but no link was established with the treatments. However, *mcr-1* and *mcr-2* genes were not detected in all tested samples. This study demonstrated that soil tetracycline and sulfonamide resistance genes reservoir can be increased after high doses swine manure applications.

Importance

Antimicrobial resistance is a worldwide public health problem. However, the environmental pathways of the spread of antimicrobial resistance bacterial as well as resistance genes from husbandry is still to be evaluated. The environment is a potential reservoir for ARGs and farming practices are suspected to play a role in the spread of these genes. In the present study, we demonstrated that swine manure applications at high doses exacerbated ARGs quantities in soil for more than four months and contributed to the spread of antimicrobial resistance in the environment. However, the recommended dose of swine manure by CRAAQ had only a short-term impact on the presence of ARGs in soil.

KEYWORDS: Hog manure, soil, drainage water, antibiotic resistance genes, *E. coli*, *Enterococcus*.

Introduction

Bacterial infections are becoming increasingly difficult to treat because of their potential antimicrobial resistance, which is a global public health threat. The inefficiency of antimicrobials leads to increased health care costs and mortality (85). In Canada, antimicrobials are used for human health care and animal breeding. Tetracyclines, sulfonamides, macrolides, lincosamides, polypeptides, streptogramins and β -lactams antimicrobial families are used for bacterial infection control and some time as growth promoter in food-producing animals (86,87).

Manure application on agricultural fields may introduce antimicrobial resistant microorganisms in soil (88). Indeed, swine manure contains resistant microorganisms and diverse antimicrobial residues that can exert a selection pressure for the acquisition of resistance genes (12). Those genes can be exchanged between bacteria and disseminated in the environment (89). Many studies have reported that the environment could be an important reservoir of ARGs (13,14,90). Tillage practices are suspected to have an impact on the propagation of ARGs in the environment through drainage water (16). However, the different pathways for the environmental dissemination of ARGs have yet to be studied (21). The bacteria already present in agricultural soil are also favored by manure spreading. In fact, the nutrients available allow microbial population stimulation in soil while increasing the number of resistance genes and genetic exchanges between the microorganisms (90).

The occurrence of tetracycline resistance genes coding for an efflux pump mechanism has often been evaluated. Otherwise, the resistance genes coding for NADPH-oxidoreductase leading to ribosomal protection such as *tet*(T) genes has been little studied (23,91). Sulfonamide resistance was often evaluated by detecting the *sul1*, *sul2* and *sul3* genes coding for an enzyme dihydropteroate synthase. Since *sul1* genes are carried by a conjugative plasmid which is bound to a class I integron, it makes it a gene of interest to assess the impact of manure spreading (25,26). The resistance to β -lactams, mediated by the *bla*_{CTX-M-1} gene, is widespread. Dissemination of penicillin and carbapenem resistant microorganisms around the world may suggest the presence of a widespread environmental reservoir (13). Colistin sulfate (CS) is a cationic antimicrobial peptide, which is approved for use in pigs in several countries (27,34). However, CS is not yet approved for use in food animals in other countries such as Canada and is used under veterinarian responsibility for the treatment of post weaning diarrhea in pigs (28). Since the first identification in 2015, of a plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, the environment has been incriminated in the global spread of colistin resistance (29). Afterwards, other plasmid-borne colistin resistance determinants *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* were identified in several countries around the world (56,92). However, the role of pig's manure application in the dissemination of colistin resistance genes in agricultural land has not been investigated.

In the present study, we evaluated the presence of ARGs in swine manure, soil and drainage water with classical and quantitative PCR at different time periods. *E. coli* and enterococci were used as indicators of fecal contamination following the addition of pig manure to the crop (17). The objectives of this study were, first, to evaluate the impact of repeated liquid

hog manure applications on the presence of antimicrobial resistant genes in soil, and second, to determine the impact of conventional or reduce tillage practices on their spread through drainage water in field crops of wheat. We hypothesis that repeated application of liquid hog manure increased the abundance of ARGs in soil and that the transport in the environment of these genes is influenced by agricultural tillage practices.

Results

***E. coli* and enterococci enumeration in liquid hog manure and soil.** The average number of *E. coli* and enterococci in hog liquid manure at spreading time was respectively 5.0 ± 0.1 log CFU/g and 4.2 ± 0.1 log CFU/g. Bacterial enumerations in soil are resumed in **table 2 and table 3**. As most of bacterial count data for *E. coli* were below the limit of detection (BDL) of 0.3 log CFU/g before hog manure application (May 9th), statistical analyzes were performed only with the other sampling dates (May 19th and September 12th). Based on type 3 fixed effects tests on *E. coli* population in soil surface (depth of 0-10 cm), there was an impact of manure dose ($p=0.0006$) and sampling date ($p<0.0001$) as well as an interaction between the two factors ($p=0.0002$). The differences were significant under a p value of 0.022, according to the statistical test structure. The amount of *E. coli* bacteria in control plots remained the same at wheat harvest ($p=0.5477$). Analysis of variance showed no statistical impact of soil depth on *E. coli* enumeration in soil ($p=0.2705$). Statistical type 3 tests of fixed effects showed that enterococci population were significantly different according to soil's depth ($p>0.0007$). There were more enterococci at a depth of 0-10 cm than at 10-20 cm ($p=0.0075$) and 20-40 cm ($p=0.0014$) for 2X manure dose after wheat harvest. There was no difference for 1X manure dose ($p>0.1046$). No significant difference was found for the enumeration of enterococci in soil between sampling dates, tillage practices and manure doses ($p>0.003$).

***E. coli* and enterococci populations in drainage water.** *E. coli* ($p<0.0001$) and enterococci ($p<0.0001$) enumeration in drainage water was influenced by sampling date based on type 3 fixed effects tests. The difference tests revealed that there were significantly more *E. coli* and

enterococci in water samples at the first sampling date corresponding to 19 days after manure application (Jun 7th) than other sampling dates corresponding to October 30th, November 4th and December 1st ($p < 0.0001$) (**tables 4 and 5**).

Abundance of ARGs in manure and soil. Mean of *tet*(T) and *sul*1 genes in liquid hog manure was respectively 8.96 ± 0.04 and 7.81 ± 0.09 log copies/g. The *tet*(T) and *sul*1 gene abundances in soil are resumed in **table 6**. According to statistical type 3 tests of fixed effects, *tet*(T) genes on the soil surface (0-10 cm) varied significantly according to fertilization type ($p < 0.0001$) and sampling date ($p < 0.0001$) with a significant interaction between the two factors ($p = 0.0012$). There was no impact on *tet*(T) gene abundance by tillage practices ($p = 0.0770$). Significant differences are shown in **figure 1**. There were more *tet*(T) genes at the 2X dose than 1X dose, demonstrating a dose effect. Moreover, control plots were all under LOD and generally had fewer genes than in manured soil. There was a significant impact on *sul*1 gene abundance according to fertilization method ($p < 0.0001$) and sampling date ($p = 0.0007$). Thereby, there was no impact of tillage practices ($p = 0.3575$). Significant differences are shown in **figure 2**. Another statistical test, done to compare each depth of soil, showed significant statistical effects on gene abundance according to soil depth ($p < 0.0001$). There was also a significant interaction between the soil depth and the sampling date ($p < 0.0001$). The differences were significant when p value was under 0.0022. At harvest, there were more *sul*1 genes on the soil surface compared to the other two soil depths ($p < 0.0001$) and there were fewer genes at a depth of 20-40 cm than at 10-20 cm ($p = 0.0009$). Thus, the deeper the soil was, the less *sul*1 resistance genes there were. As well, unmanured soil plots were all under LOD and had fewer genes than in manured soil.

The logistic regression analyses showed that the prevalence of *tet*(T) genes in soil was negatively affected by depth of soil ($p=0.03$). Also, the chances that *tet*(T) genes were present did not vary significantly with the manure dose ($p=0.21$), tillage practice ($p=0.15$) and sampling date ($p=0.35$). Total prevalence of *tet*(T) genes in soil was 76.19%. The statistical chances that the *sul1* genes were present in soil could not be assessed given the high prevalence of the gene in soil, which was 90.48%. Abundance of *bla*_{CTX-M-1} was not determined because of the low amount of gene copies in samples. All qPCR results were under LOD. Also, *bla*_{CTX-M-1} genes were detected in 3 samples of liquid hog manure, but they were not detected in all soil samples. Also, *mcr-1* and *mcr-2* genes were not detected in all samples of manure and soil.

ARGs transport in drainage water. The impact of the filtered water volume on the number of resistance gene copies was verified by a statistical test using a linear model. The volume of filtered water had a negative linear relationship with the gene abundances but was statistically not significant ($p=0.1016$). The first drainage water sampling was 19 days after liquid hog manure application. The *tet*(T) and *sul1* gene abundances in drainage water are resumed in **table 7**. Regarding *tet*(T) gene abundance, statistical type 3 tests of fixed effects showed significant statistical differences when $p<0.018$. There was a significant impact on *tet*(T) gene abundance with the sampling date ($p<0.0001$). There was no impact on *tet*(T) gene abundance by tillage practices ($p=0.8668$) and fertilization method ($p=0.3346$). According to statistical differences, *tet*(T) gene abundance decreased significantly from November 4th ($p<0.0004$). Logistic regression analyses showed that the prevalence of *tet*(T) genes in drainage water samples was not significantly affected by manure dose ($p=0.22$), tillage practice ($p=0.90$) and sampling time ($p=0.06$). Total prevalence of *tet*(T) in water samples was 54.17%. Regarding *sul1* gene

abundance, statistical type 3 tests of fixed effects showed significant statistical differences when $p < 0.025$. There was a significant impact on *sul1* gene abundance with the sampling date ($p < 0.0001$). There was no impact on gene abundance by tillage practices ($p = 0.8668$) and fertilization type ($p = 0.3346$). According to statistical differences, *sul1* gene abundance decreased significantly from June 13th ($p < 0.0053$), corresponding to 25 days after manure application. The logistic regression analyses could not be done because of the high prevalence of *sul1* genes in drainage water samples which was 94.44%. As mentioned above, *bla*_{CTX-M-1} genes have also not been quantified in drainage water. Furthermore, resistance genes were detected in 4/12 samples on October 21st and 1/12 on October 30th and November 4th that does not seem to be related to the treatments. At last, *mcr-1* and *mcr-2* genes were not detected in all samples of drainage water.

Discussion

The objectives of this study were to evaluate the impact of agricultural factors such as tillage and hog manure application on the presence of ARGs in soil and drainage water. After manure application, there was a transient increasing of abundance of ARGs in soil. Furthermore, this increase should not be exclusively attributed to the addition of ARGs contained in manure, but also to the stimulation of soil microbial populations. Manure applications add nutrients useful for crops, but these are also favorable for the growth of microorganisms already present in the soil. Thus, it is normal to observe an increase in the number of microorganisms and resistance genes in soil and drainage water samples after liquid hog manure application (93).

According to the results and statistical tests of this study, there was a significant impact on ARGs abundance in soil according to manure dose. Manure applications may have had a long-term impact than expected as there were more genes before spreading in the plots that received manure at the high manure dose (2X). This greater abundance of genes in plots fertilized with manure could be explained by the repeated applications in previous years which leads to the accumulation of these genes (21). Marti *et al.* had reported that *su1* genes were significantly higher in manured soil with doses of 79 and 112 m³/ha compared to unmanured soil (2). Even if the 2X dose is half as high, there is still a long-term impact. In the current study, the agronomic dose (1X) recommended by CRAAQ did not have a long-term impact on the abundance of *su1* and *tet*(T) genes in soil (see **table S4** for manure and fertilizer compositions). These genes were not quantifiable in control plots receiving mineral fertilizer. The mean of gene abundance was under LOD. Otherwise, ARGs detection had statistically the same prevalence in

each fertilization type plots. The different fertilization treatments did not affect the prevalence of *tet*(T) and *sul1* genes, but still affected the abundance of these in soil samples. Previously, some authors detected the *tet*(T) genes in manured soil as in unmanured soil (91). Later, the same research team reported that the relative abundance of *sul1* gene was significantly higher in manured than in unmanured soil for a least one season (2).

In the current study, there were more *tet*(T) and *sul1* genes in the soil receiving 2X manure at harvest, suggesting that the delay between application and harvest is not sufficiently long to allow the return of gene abundance to background levels. It is generally recommended to harvest at least 90 to 120 days after manure application to ensure that human pathogens are at acceptable levels (2,78). The presence of ARGs in soil following manure application varies depending on various factors such as the manure source, spreading time, weather and soil type. It has been reported that fall application has tended to increase gene detection frequency in soil. Early spring application had a lower abundance of ARGs than late autumn application despite the fact that more genes remained in the fertilized plots than in the control plots that received only mineral fertilizers (2). Garder *et al.* published results showing an increase in *erm*(B) and *erm*(F) genes in a loam soil following the application of swine manure in France, but the abundance decreased until levels equivalent to those observed in unmanured plots were reached, after twelve months. It was mentioned that the detection of other resistance genes could have led to other results and conclusions (16). Moreover, heavy metals as well as residues of antimicrobials are added to the soil during manure application. ARGs have been associated with heavy metal resistance genes, allowing for co-selection to antimicrobial resistance (88). In

addition, subtherapeutic levels of antimicrobial substances in soil and water exert selective pressure for gene acquisition in indigenous environmental microorganisms (94).

In the current study, *bla*_{CTX-M-1} genes were not quantifiable in any samples. Indeed, the prevalence of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) genes has been associated to high use of antimicrobials such as penicillins and cephalosporins in livestock production (95). The results could have been different depending on the use of antimicrobials. A study in France enabled researchers to detect the *bla*_{CTX-M-1} or 9 and *bla*_{TEM-71} genes in the soil of different crop farms receiving organic fertilizers. Moreover, this study suggested that beta-lactam resistance may be caused by genes other than these ones (13).

In the current study, *mcr-1* and *mcr-2* genes were not detected in liquid hog manure, soil and drainage water samples. In fact, these results corroborated with the restricted use of colistin in pig farms in Canada, being used mainly for the treatment of post-weaning diarrhea in piglets (96). On the other hand, Guenther et al. reported the identification of *mcr-1* gene in manure from pig farms in Germany, and this finding was associated with the important use of colistin at these farms (97).

Conventional or reduced tillage practices did not have a significant impact on ARGs quantities in soil and drainage water. The study of Garder et al. did neither demonstrate that soil tillage had an impact on the presence of erythromycin resistance genes in soil and transport of these genes in drainage water. They also indicated that the detection of other resistance genes could have led to other results and conclusions (16). To date, the current study is the only other

one that evaluated the impact of tillage on the transport of ARGs in drainage water. Other studies will be needed to fully understand the link between tillage practices and transport of these genes into the environment through drainage water, while considering the different characteristics of each cultivated region (weather, humidity, soil type and more). It is known that tillage practices can have an impact on the movement of water through the soil macropores (80). Also, researchers reported that the diversity of soil microorganisms is greater at the soil surface with reduced tillage practices (79). There were less *sul1* genes in deeper soil than in soil surface. The *tet(T)* gene abundance was not significantly influenced by soil depth, but it was the case for *sul1* genes for the whole season. From October 30th, a significant decrease in bacterial count was observed as well as a decrease in *tet(T)* genes in drainage water. The *sul1* genes decreased significantly in water samples from June 13th. These results in soil and water can be explained by the smaller number of sulfonamide-resistant microorganisms found in drainage water. Indeed, the *sul1* gene has often been associated with genetic mobile elements and then indigenous soil microorganisms could have acquired these genes at different soil depth (21). In 2016, the months of May and June were quite humid in Saint-Lambert-de-Lauzon with rainfall of up to 144 mm of rain in June. Thus, during rain events, there is runoff water as well as drainage water. It is possible that antimicrobial resistant microorganisms and ARGs have left the agricultural land in the runoffs. Bacterial counts and detection of resistance genes in water are inevitably influenced by weather conditions (98).

Results of our study must be interpreted in the context of the agricultural lands of the Chaudière-Appalaches region of Quebec where humid weather conditions prevail. Marti et al. hypothesized that climatic conditions could have an impact on gene abundance. They reported

that warmer, drier conditions reduce the persistence of resistant bacteria while cooler, wet conditions promote the growth of resistant bacteria (2). Humid weather conditions in this study may have influenced genes and bacteria transport in drainage water as well as their abundance in soil. Taken together, our results suggest that according to various agricultural activities, soil could be a reservoir of tetracycline and sulfonamide resistance genes and resistant bacteria.

Acknowledgements

This study was founded by Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Quebec (MAPAQ).

We thank K. Roseberry, A. Fortin, E. Latour and T. Raymond for their important technical support in the laboratory in this project. We also thank all the farm workers and our farm cooperators. We would like to thank Dr. Pascal Sanders and Prof. Dr. Surbhi Malhorta-Kumar for providing DNA from *Escherichia coli* harboring respectively, *mcr-1* and *mcr-2* genes.

Materials and methods

Field operations. The site is a long-term experimental field implanted in 1978 and managed at the IRDA research farm located Saint-Lambert-de-Lauzon, Quebec, Canada. Since 1998, agricultural drains network was placed at 90 centimeters below the ground surface, allowing drainage water sampling for each treatment individually. Since the spring of 2011, half of plots were subject to a reduced tillage, and the other half to a conventional work. Reduced tillage was done after swine manure application with a harrow, while conventional tillage work was a late season chisel and two harrow passes, before and after manure application in spring before planting. Crop rotation is corn, wheat and canola since 2006, all plots being dedicated to corn production before this period. The surface texture of soil varies from a silty clay loam and loam, through a silt loam and clay loam. Each treatment is repeated twice in the field for a total of 12 plots of 6 by 15 meters. The plots are divided with tillage mode as the main plot factor and fertilization mode as the subplot factor. Drainage water flow was measured, and weather data were recorded (**figure S1 and table S1**). Manure was taken from a fattening pig farm in an open pit. Depending on nitrogen requirements in 2016, the land received hog manure applications at a rate of 0 (control plot), 20 (1X) or 45 (2X) m³ ha⁻¹ on May 19th, 2016. It is noteworthy that 20 m³ ha⁻¹ is the dose recommended by the Reference Center in Agriculture and Agri-food in Quebec (CRAAQ) (99). The control plots received equivalent nitrogen levels to manure-fertilized plots with an inorganic (N-P-K-Mg) fertilizer in ratio of 27-46-22-11.

Sample collection of swine manure, soil and drainage water. Liquid hog manure was collected three times during its application to be representative of the whole application. Soil

was sampled for each treatment 10 days prior to spreading slurry, on the day of manure application after spreading, and 116 days after spreading, corresponding to the harvest day. Soil was sampled in each plot at a depth of 0-10 cm, 10-20 cm and 20-40 cm before manure application and at the harvest day for a total of 84 samples. A mixture of 5 sub-samples distributed randomly in each plot was made to be representative of the treatment plots. Drainage water was collected at each flow drainage water event, which was defined as when water debit was higher than 30 liters per hour. In 2016, six drainage water samplings were done for a total of 72 samples. Each sample was collected aseptically to avoid cross contamination and to maintain the integrity of our samples.

Isolation of *E. coli* and *Enterococcus* spp. Bacteria have been counted with the official protocols of CEAEQ MA.700-Ec.BCIG 1.0 for the isolation of *E.coli* in water samples and MA.700-Ent 1.0 for the isolation of *Enterococcus* spp. in water. Based on the previous two procedures, a protocol was adapted for the isolation of Enterococci in soil and swine manure samples. However, enterococci has been confirmed with Enterolert* test kit based on IDEXX's patented Defined Substrate Technology* (DST*). Bacterial counts (copies/g of manure or soil, and copies/mL of drainage water) was normalized with logarithm in base 10.

Genomic DNA extraction. 40 mg of soil and liquid hog manure were weighed to carry out DNA extraction. Drainage water were filtered with a maximum of 250 mL per membrane with 0.45 µm pores to recover microorganisms and suspended matter. The manure, soil and water membrane were then placed in extraction kit microtubes. DNA extraction was done with the

Fast DNA Spin Kit for feces and soil in combination with the FastPrep[®] system from MO BIO Laboratories Inc. To isolate genomic DNA in water samples, the kit for soil was used. A DNA fragment of lambda gene have been used as control for the extraction and DNA amplification steps (100). A quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed for the detection of this lambda phage gene fragment to estimate the genomic DNA extraction yield. DNA extracts were quantified with Tecan Infinite F200 Pro spectrophotometer.

Quantification and detection of target genes. A qPCR was performed with a BIORAD CFX96 real-time PCR instrument. qPCR reactions were done with the master mix SsoAdvanced[™] Universal Inhibitor-Tolerant SYBR[®] Green Supermix from BIORAD. DNA amplification protocol of *tet*(T) and *sul1* genes was: 5 minutes of initial denaturation step, 40 cycles of 30 seconds each denaturation, hybridization and elongation step and a final elongation step at 72°C for 5 minutes. For *bla*_{CTX-M-1} gene, the elongation step was performed for 20 seconds. Purity of the PCR product was confirmed with a melting curve. Temperature and primer specifications are summarized in **table 1**. To quantify the ARGs, a standard curve was made using at least 7 known concentrations of a specific gene fragment. The sequence of these synthetic gene fragments is available in supplementary material (**table S2**). The specificity of each primer with the targeted DNA sequence has been verified on <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. All primers and antimicrobial resistance gene fragments were synthesized by IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Iowa, USA). qPCR reactions contained 2 uL of sample DNA corresponding to an amount ranging from 8.75 to 11.5 ng of manure DNA, 0.25 to 20.75 ng of soil DNA or 0 to 2.25 ng of water DNA. Each run was performed in triplicate and deionized water was used as negative control. Total volume of qPCR reaction was 25 uL. The

detection limit (LOD) of PCR method was determined according to the last point of the standard curve that had at least 2 of 3 replicas with a specific signal. The quantification limit (LOQ) of the method was determined according to the last point of the standard curve that had 3 replicas with a specific signal to repeat. LOQ and LOD of targeted genes was 98,4 to 357 and 14,3 to 38,9 copies per PCR reaction respectively. An internal amplification control (IAC) has been added to ensure that the PCR reaction is not inhibited and that there are no false negatives (see **table S3** for IAC primers and sequences) (100).

Data analysis and statistical methods. Results were analyzed using ANOVA with a significance level at a p value of 0.05. When the hypothesis tests proved significant, Benjamini-Hochberg adjustment was done and the p value has been adjusted. Each significant treatment mean was compared with statistical differences. The impact of all factors on the presence of *tet(T)* genes in soil and drainage water samples was verified by logistic regression procedure. None could be performed on other resistance genes because of low or high prevalence. All statistical analyses were done with SAS v.9.4 program.

Tables & figures

Table 1 Protocol and primers selected for the quantitative PCR

Name	Sequence (5' → 3')	Product size (bp)	Primer concentration (nM)	Denaturation temperature (°C)	Annealing temperature (°C)	Primer references
<i>tet</i> (T)						
tet(T)-F	AAGGTTTATTATATAAAAGTG	167	250	94	46	(91,101)
tet(T)-R	AGGTGTATCTATGATATTTAC					
<i>sul1</i>						
sul1-F	GACTGCAGGCTGGTGGTTAT	105	200	98	64	(2)
sul1-R	GAAGAACCGCACAAATCTCGT					
<i>bla</i> _{CTX-M-1}						
CTX-M-F469	CAGCTGGGAGACGAAACGTT	64	400	98	60	(13,91)
CTX-M-R532	CCGGAATGGCGGTGTTTA					

Table 2 *E. coli* population in soil by sampling date and depth

Sample date 2016 ^a	Depth (cm)	Log ₁₀ CFU/g wet soil (mean ± SD ^c ; n=4)		
		Mineral fertilizers	Manure 1X	Manure 2X
May 9 th	0-10	BDL ^b	BDL ^b	0,4 ± 0.1
	10-20	BDL ^b	BDL ^b	BDL ^b
	20-40	BDL ^b	BDL ^b	BDL ^b
May 19 th	0-10	0,4 ± 0.2	2,3 ± 0.6	3,1 ± 0.2
September 12 th	0-10	BDL ^b	0,5 ± 0.2	0,6 ± 0.3
	10-20	0,5 ± 0.3	BDL ^b	BDL ^b
	20-40	0,4 ± 0.1	0,4 ± 0.1	BDL ^b

^aMay 9th was before hog manure application, May 19th was after manure application and September 12th was at harvest. ^bBDL indicates that count was below the detection limit of 0.3 log CFU/g. ^cSD means standard deviation.

Table 3 Enterococci population in soil by sampling date and depth

Sample date 2016 ^a	Depth (cm)	Log ₁₀ CFU/g wet weight soil (mean ± SD ^c ; n=4)		
		Mineral fertilizers	Manure 1X	Manure 2X
May 9 th	0-10	BDL ^b	0.4 ± 0.1	BDL ^b
	10-20	BDL ^b	BDL ^b	BDL ^b
	20-40	BDL ^b	BDL ^b	1.0 ± 1.3
May 19 th	0-10	0.4 ± 0.1	1.4 ± 0.7	2.6 ± 0.4
September 12 th	0-10	1.4 ± 1.1	1.2 ± 0.4	1.9 ± 1.1
	10-20	1.1 ± 0.9	0.9 ± 0.3	1.0 ± 0.6
	20-40	0.6 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.4

^aMay 9th was before hog manure application, May 19th was after manure application and September 12th was at harvest. ^bBDL indicates that count was below the detection limit of 0.3 log CFU/g. ^cSD means standard deviation.

Table 4 *E. coli* population in drainage water at each drains flow event

Soil fertilization	Log ₁₀ CFU/100mL of water (mean ± SD ^b ; n=4)					
	07-juin	13-juin	21-oct	30-oct	04-nov	01-déc
Mineral fertilizer	2,4 ± 0.2	1,2 ± 0.3	1,7 ± 1.3	0,4 ± 0.5	0,1 ± 0.2	BDL ^a
Manure 1X	2,83 ± 0.24	1,9 ± 0.2	2,0 ± 1.0	0,6 ± 0.5	0,5 ± 0.8	0,1 ± 0.2
Manure 2X	2,95 ± 0.28	2,2 ± 0.3	1,0 ± 0.1	0,5 ± 1.0	0,4 ± 0.7	0,2 ± 0.4

^aBDL indicates that count was below the detection limit of 0.3 log CFU/g. ^bSD means standard deviation.

Table 5 Enterococci population in drainage water at each drains flow event

Soil fertilization	Log ₁₀ CFU/100mL of water (mean ± SD ^a ; n=4)					
	07-juin	13-juin	21-oct	30-oct	04-nov	01-déc
Mineral fertilizer	2,6 ± 0.2	1,8 ± 0.2	2,6 ± 0.3	0,9 ± 0.7	0,6 ± 0.4	0,6 ± 0.8
Manure 1X	2,5 ± 0.0	2,0 ± 0.1	2,3 ± 0.4	0,5 ± 0.6	0,2 ± 0.2	0,8 ± 0.4
Manure 2X	2,8 ± 0.2	1,9 ± 0.2	2,5 ± 0.3	1,1 ± 0.3	0,4 ± 0.3	1,2 ± 0.8

^aSD means standard deviation.

Table 6 Abundance of tetracycline and sulfonamide resistance genes in soil

Sampling date 2016 ^a	Depth (cm)	Log ₁₀ copies/g of wet soil (mean \pm SD ^b ; n=4)					
		Mineral fertilizers		Manure 1X		Manure 2X	
		<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> 1	<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> 1	<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> 1
May 9th	0-10	4.04 \pm 0.69	4.81 \pm 0.36	4.74 \pm 0.66	5.20 \pm 0.25	5.09 \pm 0.05	5.50 \pm 0.31
	10-20	4.04 \pm 0.69	4.29 \pm 0.01	5.08 \pm 0.04	4.88 \pm 0.42	5.09 \pm 0.04	5.06 \pm 0.11
	20-40	3.85 \pm 0.01	4.29 \pm 0.01	3.84 \pm 0.00	4.63 \pm 0.41	4.20 \pm 0.69	5.16 \pm 0.17
May 19th	0-10	4.14 \pm 0.00	4.63 \pm 0.40	5.39 \pm 1.50	5.68 \pm 0.21	7.17 \pm 0.38	6.05 \pm 0.17
September 12th	0-10	3.85 \pm 0.00	5.03 \pm 0.08	3.86 \pm 0.01	5.78 \pm 0.32	5.25 \pm 0.01	6.26 \pm 0.14
	10-20	3.85 \pm 0.01	4.64 \pm 0.41	4.20 \pm 0.69	4.91 \pm 0.42	4.21 \pm 0.70	5.11 \pm 0.60
	20-40	4.15 \pm 0.01	4.29 \pm 0.01	4.15 \pm 0.01	4.29 \pm 0.01	4.49 \pm 0.70	4.67 \pm 0.45

^aMay 9th was before hog manure application, May 19th was after manure application and September 12th was at harvest. ^bSD means standard deviation.

Table 7 **Abundance of tetracycline and sulfonamide resistance genes in drainage water**

Sampling date 2016	Log ₁₀ copies/100 mL (mean ± SD ^a ; n=4)					
	Mineral fertilizers		Manure 1X		Manure 2X	
	<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> I	<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> I	<i>tet</i> (T)	<i>sul</i> I
June 7th	2,10 ± 0.22	2,86 ± 0.59	2,00 ± 0.22	2,72 ± 0.45	2,19 ± 1.22	2,83 ± 1.49
June 13th	1,16 ± 0.81	0,89 ± 0.59	1,50 ± 0.70	1,36 ± 0.52	2,05 ± 0.33	1,68 ± 0.28
October 21st	1,38 ± 0.84	1,62 ± 0.24	1,36 ± 0.90	1,66 ± 0.21	2,21 ± 0.35	1,83 ± 0.38
October 30th	0,86 ± 0.67	0,65 ± 0.11	0,86 ± 0.67	1,00 ± 0.44	0,87 ± 0.83	1,18 ± 0.41
November 4th	0,51 ± 0.10	0,65 ± 0.10	0,50 ± 0.08	0,64 ± 0.08	0,51 ± 0.11	1,00 ± 0.48
December 1st	0,53 ± 0.15	0,67 ± 0.15	0,59 ± 0.16	0,91 ± 0.29	0,56 ± 0.15	1,22 ± 0.44

^aSD means standard deviation.

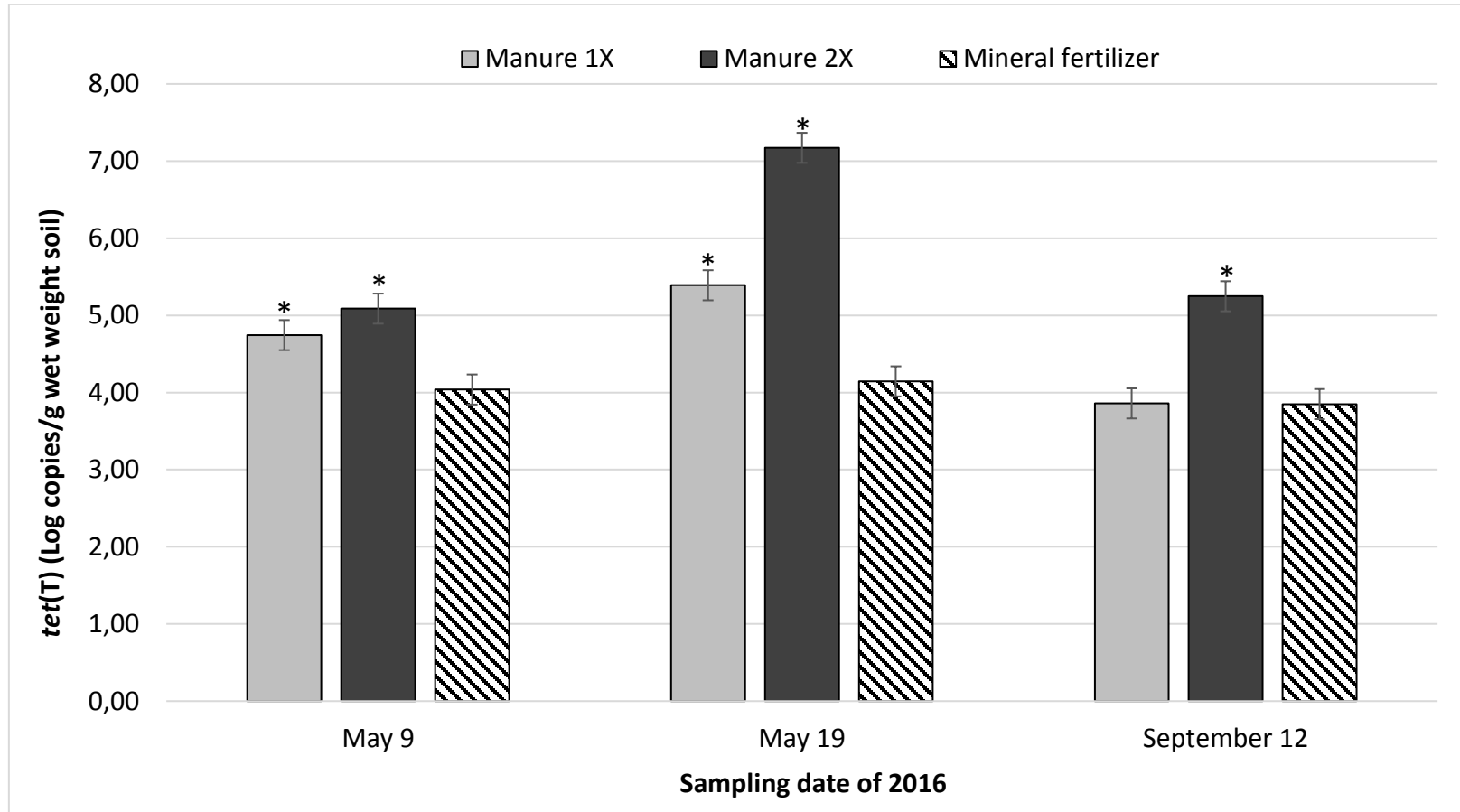


Figure 1 *tet(T)* gene abundance in the soil surface (0 to 10 cm). May 9th was before hog manure application, May 19th was after manure application and September 12th was at harvest. LOQ intervals were 5.06 to 5.54 log copies/g and LOD intervals were 3.66 to 4.16 log copies/g. Differences are significant at *P* value under 0.027. * indicate averages that are significantly higher than those of control plots (mineral fertilizers).

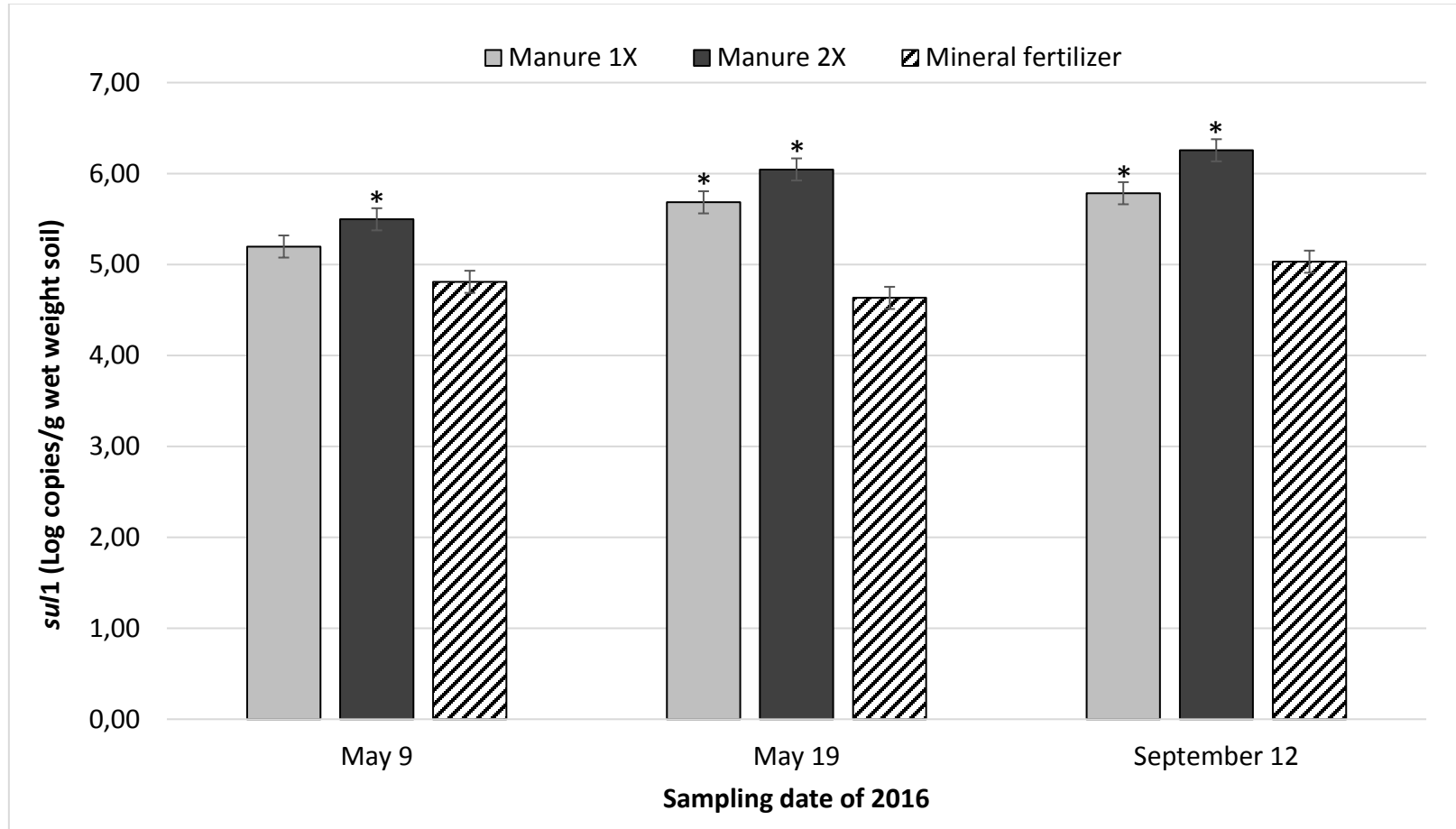


Figure 2 *su1* gene abundance in the soil surface (0 to 10 cm). May 9th was before hog manure application, May 19th was after manure application the day of spreading and September 12th was at harvest. LOQ intervals were 4.98 to 5.00 log copies/g and LOD intervals were 4.28 to 4.30 log copies/g. Differences are significant at *P* value under 0.022. * indicate averages that are significantly higher than those of control plots (mineral fertilizers).

Supplementary materials

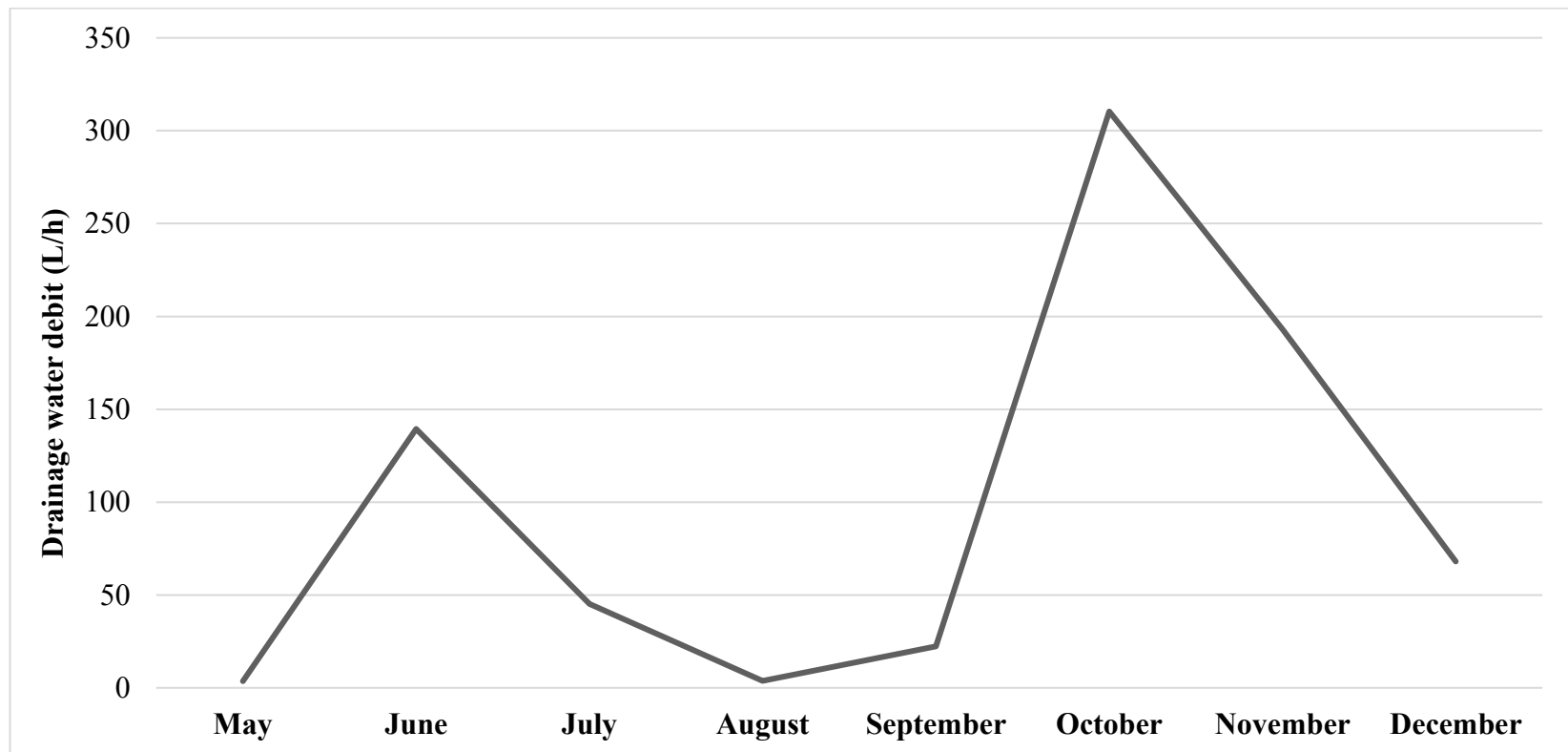


Figure S1 Monthly drainage water flow. Averages of water flow were calculated by combining all agricultural plots and treatments.

Table S1 Weather at the experimental site of Saint-Lambert-de-Lauzon, Quebec, Canada

Month of 2016	Max Temp (°C)	Average Temp (°C)	Min Temp (°C)	Total rainfall (mm)
January	7,0	-7,7	-22,8	57
February	7,4	-8,3	-27,1	125
March	15,3	-3,6	-26,4	126
April	19,5	1,4	-15,1	38
May	29,7	12,0	-3,5	65
June	31,2	17,0	5,3	144
July	31,6	19,1	8,9	205
August	31,1	19,6	8,0	106
September	28,9	14,4	0,1	83
October	25,5	7,4	-1,8	177
November	14,7	2,5	-4,6	132
December	3,6	-7,3	-26,7	122

Table S2 Nucleotide sequence used as standard qPCR curve

Gene target	Standard sequence ^a (5' – 3')	Accession #
<i>tet</i> (T)	ACAGAAGGTTTATTATATAAAAAGTGGGGCGATTAATAAAATTGGAAGAGTTG ATAATGCTACAACGACAACGGATTCGATGGAACTTGAAAGAGATAGGGGAAT AACTATACGGGCGTCTACAGTTTCATTTAATTACAATGATACAAAGGTAAATA TCATAGATACACCTGGGC	L42544.1
<i>sul1</i>	TTGCTGAGGCGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGCACTCAGCGCAGCGGGATGG CATCGCCACCCGCACCGGTCACCTTCGACCCGAAGACGCGCTCGACGAGATT GTGCGGTTCTTCGAGGCGCGGGT	U12441.2
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	TGCGATGTGCAGCACCAGTAAAGTGATGGCCGCGGCCGCGGTGCTGAAGAAAAGT GAAAGCGAACCGAATCTGTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAAAATCTGACCTTG TTAACTATAATCCGATTGCGGAAAAGCACGTCAATGGGACGATGTCACCTGGCTGA GCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGATAACGTGGCGATGAATAAGCTGATT GCTCACGTTGGCGGCCCGGCTAGCGTCACCGCGTTTCGCCCCGACAGCTGGGAGAC GAAACGTTCCGTCTCGACCGTACCGAGCCGACGTTAAACACCGCCATTCCGG GCGATCCGCGTGATACCA	JN194214.1

^aThe nucleotides targeted by the primers are made bold.

Table S3 **Sequence of the lambda gene fragment^a**

Gene target	IAC primers (5' – 3')	IAC sequence target^b (5' – 3')
<i>tet(T)</i>	IAC-TetT-F AGGTTTATTATATAAAAAGTGGTCCGATATC ACGAA	ACAGAAGGTTTATTATATAAAAAGTGGTCCGATATCA CGAAGGATAAATGCAGCAAATGCCTGAGCGGTGT AAGTTCCGCAATAACGTCGGCAACTTTGGCGGCTTC CTTTCCATTAACAAACTTTTCGCAGTAAATCCCATGA CACAGACAGAATCAGCGATTCTGGCGCACGCCCGG CGATGTGCGCCAGCGGAGTCGTGCGGCTTCGTGGT AAGCACGCCGGAGGGGGTAAATATCATAGATACAC CTGGGC
	IAC-TetT-R AGGTGTATCTATGATATTTACCCCTCCGGC GTG	
<i>sul1</i>	IAC-Sul1-F GACTGCAGGCTGGTGGTTATGTCCGATATC	TTCGGGACTGCAGGCTGGTGGTTATGTCCGATATCA CGAAGGATAAATGCAGCAAATGCCTGAGCGGTGT AAGTTCCGCAATAACGTCGGCAACTTTGGCGGCTTC CTTTCCATTAACAAACTTTTCGCAGTAAATCCCATGA CACAGACAGAATCAGCGATTCTGGCGCACGCCCGG CGATGTGCGCCAGCGGAGTCGTGCGGCTTCGTGGT AAGCACGCCGGAGGGGACGAGATTGTGCGGTTCTT CTGTT
	IAC-Sul1-R GAAGAACCGCACAAATCTCGTCCCCTCCGGC	
<i>bla_{CTX-M-1}</i>	IAC-bla-F469 CAGCTGGGAGACGAAACGTTGTCCGATATC	TGCGCAGCTGGGAGACGAAACGTTGTCCGATATCAC GAAGGATAAATGCAGCAAATGCCTGAGCGGTGT AGTTCCGCAATAACGTCGGCAACTTTGGCGGCTTCC TTTCCATTAACAAACTTTTCGCAGTAAATCCCATGAC ACAGACAGAATCAGCGATTCTGGCGCACGCCCGG GATGTGCGCCAGCGGAGTCGTGCGGCTTCGTGGTA AGCACGCCGGAGGGGGTAAACACCGCCATTCCGGAC CA
	IAC-bla-R532 CCGGAATGGCGGTGTTTACCCCTCCGGCGT	

^aLambda gene fragment was used as an internal control amplification (IAC). ^bThe nucleotides targeted by the primers are made bold.

Table S4 Liquid hog manure composition

Dry matter (%)	Total N (%)	NH₄-N (mg/kg)	C/N	P (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)	Mg (mg/kg)	pH
4.96	0.46	2790	3.86	1048	2240	1194	626	6.95

4. DISCUSSION GÉNÉRALE

La résistance antimicrobienne est très répandue autant chez les microorganismes d'origine clinique qu'environnementale. L'environnement est suspecté de jouer un rôle important dans la propagation et la dissémination des GRAs à travers le monde. Les pratiques agricoles contribuent à l'ajout de MRAs dans l'environnement lors des épandages de fumiers (2,6,13,14). Ce projet d'étude a permis d'évaluer la présence de GRAs dans le sol à différentes profondeurs suivant les épandages répétés de lisier de porc en grandes cultures. L'effet du travail conventionnel comparé au travail réduit du sol sur le transport de ces gènes dans l'environnement via l'eau de drainage a aussi été évalué.

4.1 Interprétation des résultats

L'épandage de lisier de porc a entraîné une augmentation de l'abondance des gènes *sul1* et *tet(T)* de manière transitoire. Cependant, à la dose élevée de lisier de porc (2X), la quantité de gènes est restée significativement plus élevée jusqu'à la récolte du blé en septembre. Ces résultats suggèrent que l'épandage de lisier de porc à une dose agronomique serait préférable afin de diminuer la propagation des GRAs à travers les cultures. De plus, il semble qu'un délai de 116 jours après l'épandage du lisier de porc n'a pas été suffisant pour éliminer les risques potentiels de résistance antimicrobienne dans le sol. Plusieurs études ont rapporté des abondances élevées de GRAs dans des sols ayant reçu du lisier de porc pendant plus d'une saison de culture (2,13,16,19–21).

L'environnement est un réservoir naturel de GRAs (6,13,21). La détection des gènes dans les échantillons de sol et d'eau provenant des parcelles n'ayant reçu que des engrais

minéraux a permis de mieux connaître les quantités et prévalences de ceux-ci dans des conditions exemptes de fertilisants organiques depuis plusieurs années. Ainsi, ce « bruit de fond » d'abondance et de prévalence des GRAs a été comparé avec les autres parcelles ayant reçu du lisier de porc. Fait intéressant, les gènes *sul1* avaient des prévalences élevées dans toutes les parcelles tandis que l'abondance de ceux-ci variait selon les traitements. Les gènes *sul1* ont été retrouvés dans différents types de sol qui n'étaient pas toujours fertilisés avec des engrais organiques démontrant ainsi que les microorganismes indigènes du sol peuvent les posséder (2,20,22,102). Les gènes *tet(T)* ont eu des prévalences légèrement plus faibles, mais ont tout de même été statistiquement les mêmes pour toutes les parcelles, sauf pour la 3^e profondeur de sol (20-40cm) qui était significativement plus faible que les deux autres profondeurs. Il semble ainsi qu'il y ait déjà un réservoir établi de gènes *sul1* et *tet(T)* dans le sol, mais que la quantité de ceux-ci a significativement augmenté après les épandages de lisier de porc de manière transitoire pour la dose de lisier de porc recommandée par le CRAAQ et à long-terme pour la dose plus élevée (2X).

Les résultats obtenus durant cette étude n'ont pas pu démontrer que le travail du sol a eu un impact sur le transport des GRAs dans l'eau de drainage. L'étude réalisée par Garder et *al.* (2010) mena aussi à cette conclusion alors qu'ils comparaient l'abondance des gènes de résistance aux MLS_B *erm(B)* et *erm(F)* lors d'un travail réduit et un travail conventionnel du sol réalisé au chisel. Ils ont rapporté qu'une détection d'autres GRAs aurait pu mener à d'autres conclusions. Comme leur étude a été menée en Iowa avec des conditions météorologiques et un type de sol différents de la région Chaudière-Appalaches du Québec, ceci peut expliquer les différences obtenues dans le cadre de ce projet de maîtrise (16). Il est également à noter que la

provenance du lisier de porc peut avoir eu un impact puisque l'usage des antimicrobiens diffère entre le Canada et les États-Unis (4,6,27). Peu d'études ont évalué l'effet de différentes pratiques de travail du sol sur la présence et le transport des GRAs à travers l'eau de drainage. Il est connu qu'un sol peu ou pas travaillé possède des voies préférentielles d'écoulement de l'eau (macropores), ce qui pourrait influencer le transport des microorganismes dans l'eau de drainage (80). Cependant, l'étude de Stoddard et *al.* (1998) n'a pas permis de démontrer que le transport des microorganismes indicateurs de contamination fécale dans le sol avait eu un impact en fonction du type de travail du sol ou du moment de l'épandage des fumiers (81). Les résultats obtenus dans la présente étude ont généralement démontré qu'il y avait davantage des gènes *tet*(T) dans l'eau de drainage pendant plus de 155 jours après l'épandage. Les gènes *sul1*, pour leur part, ont persisté pendant plus de 19 jours. La diminution des gènes *tet*(T) semble être corrélée avec la diminution du nombre de bactéries *E. coli* et entérocoques. Par ailleurs, ce n'est pas le cas pour les gènes *sul1*. Ce gène a souvent été associé à l'intégron de classe 1 (*int1*), ce qui lui permet de se propager plus facilement chez d'autres microorganismes (21,22).

La résistance aux β -lactamines est très répandue chez plusieurs microorganismes pathogènes en médecine animale et humaine (13). Les gènes *bla*_{CTX-M-1} n'ont pas été quantifiables, mais ils ont tout de même été détectés dans le lisier de porc et quelques échantillons d'eau de drainage. La présence des gènes BLSEs a été associée à l'usage des pénicillines et des céphalosporines en production animale (95). Les pénicillines sont davantage utilisées chez les jeunes porcs que ceux en engraissement et en croissance-finition (68). Aussi, il existe un large éventail de gènes qui peuvent mener à une résistance aux β -lactamines qui ont

été détectés dans des sols fertilisés avec du lisier de porc, tels que *bla*_{TEM-71} (13), *bla*_{SHV} (19) et *bla*_{OXA-20} (91).

Les gènes de résistance à la colistine, *mcr-1* et *mcr-2*, n'ont été détecté dans aucun échantillon de lisier de porc, de sol et d'eau de drainage. Cela dit, ce résultat était attendu puisque la colistine n'est pas autorisée au Canada en élevage. Cet antimicrobien est tout de même autorisé dans d'autres pays comme la Chine. Puisqu'il est de très haute importance en santé publique et que le nombre de microorganismes résistants à la colistine a augmenté dans les dernières années, il est probable que l'environnement ait joué un rôle dans leur dissémination à travers le monde (27).

4.2 Aspects innovateurs

Ce projet de maîtrise a permis d'étudier la résistance antimicrobienne environnementale dans la région Chaudière-Appalaches du Québec sur une terre agricole de longue durée. Il s'agissait de la première étude concernant l'impact des épandages de lisier de porc sur la présence des GRAs dans le sol et l'eau de drainage au Québec. Aussi, c'était la première fois que les gènes *mcr-1* et *mcr-2* étaient recherchés dans des échantillons de sol et d'eau de drainage au Canada. De plus, très peu d'études ont accès à des sites expérimentaux qui reçoivent des doses identiques de lisier de porc et les mêmes méthodes de travail du sol depuis plus de 3 ans. En effet, il est difficile d'affirmer que les résultats obtenus lors d'études antérieures sont entièrement liés à l'épandage de lisier de porc dans l'année d'expérimentation plutôt qu'aux actions agricoles antérieures. Ce projet de recherche permet ainsi, sur une terre agricole recevant

les mêmes traitements depuis plus de 20 ans, de mieux comprendre l'impact des pratiques agricoles sur la présence des GRAs. Il convient de noter qu'il y a tout de même une autre étude, réalisée par Garder et *al.* (2010), où une terre agricole de longue durée avait été utilisée en Iowa. Cependant, les résultats de leur étude n'avaient pu démontrer que les épandages de lisier de porc avaient un impact sur l'abondance des gènes *erm*(B) et *erm*(F) dans le sol et l'eau de drainage en comparant à leurs parcelles contrôles.

4.3 Limites de l'étude

L'un des grands défis à relever lors d'analyses génétiques d'échantillons environnementaux est la présence de divers inhibiteurs de polymérases dans les extraits d'ADN. Généralement, les acides humiques et fulminiques se retrouvent en grande quantité dans le sol et ne peuvent pas être éliminés entièrement lors des extractions d'ADN. Ces deux acides peuvent inhiber la polymérase à de faibles concentrations, ce qui peut empêcher la détection des fragments de gènes ciblés. Les fertilisants organiques peuvent contenir des lipides, des protéines, des métaux lourds ainsi que des ribonucléases tandis que les échantillons d'eau peuvent contenir l'acide fulvique, l'acide humique, des métaux lourds et des polyphénols (83). Dans le cadre de ce projet, l'absence d'inhibition des réactions qPCR a été vérifiée à l'aide d'un IAC, un fragment de gène amplifié en parallèle dont la concentration est connue. Les extraits d'ADN de lisier de porc et de sol ont dû être dilués afin de diminuer la concentration d'inhibiteurs, ce qui a aussi diminué la concentration d'ADN. De ce fait, due à la réduction de sensibilité de la méthode, les résultats négatifs obtenus peuvent être, dans certains cas, des faux négatifs.

En milieu agricole, plusieurs facteurs influencent la présence des GRAs dans le sol et le transport de ceux-ci dans l'eau de drainage. En effet, le type de sol, la température, les précipitations, l'humidité, les méthodes de travail du sol, le pH ainsi que les méthodes de fertilisation sont tous des facteurs qui doivent être pris en considération lors de la comparaison des résultats obtenus entre les études (2,16). Aussi, d'autres études ont rapporté que des facteurs physiques tels que le vent et l'eau peuvent aussi être des sources de MRAs et leurs gènes de résistance (103). En 2016, les mois de mai et juin se sont avérés être assez humides à Saint-Lambert-de-Lauzon avec des précipitations allant jusqu'à 144 mm de pluie en juin. Ainsi, lors des événements de pluie, il y a de l'eau de ruissellement tout comme de l'eau de drainage. Étant donné la quantité de pluie tombée après l'épandage du lisier de porc en mai, il est possible qu'il y ait eu des MRAs et GRAs qui aient quitté la terre agricole via l'eau de ruissellement. Les dénombrements bactériens et la détection des gènes de résistance dans l'eau sont inévitablement influencés par les conditions météorologiques (98).

Malgré le fait que les activités anthropiques peuvent accroître l'abondance, la diversité et la propagation des MRAs, il y a un réservoir naturel de GRAs dans l'environnement. Il est important de discriminer un réservoir naturel de gènes de résistance de celui qui a été amplifié par l'action humaine. Les épandages de fumiers ajoutent des nutriments utiles pour les cultures, mais ceux-ci sont aussi favorables à la croissance des microorganismes déjà présents dans le sol (93). Ainsi, il est normal d'observer une augmentation du nombre de microorganismes et de gènes de résistance dans les échantillons de sol et d'eau de drainage après l'épandage du lisier de porc. En conséquence, l'augmentation de l'abondance des GRAs après l'épandage du lisier de porc peut aussi être attribué à la stimulation des microorganismes indigènes du sol.

La compréhension du rôle des activités agricoles dans la dissémination et l'acquisition de ces gènes dans l'environnement chez des microorganismes pathogènes pour les humains doit encore être approfondie. La détection des GRAs dans les échantillons de lisier de porc, de sol et d'eau n'est pas suffisante pour décrire le potentiel d'échange génétique entre les microorganismes ajoutés lors de l'épandage et ceux déjà présents naturellement dans l'environnement. La détection d'éléments mobiles génétiques tels que les transposons et les intégrons permettrait de mieux connaître les potentiels d'échanges génétiques entre les microorganismes et les différents environnements (18). Il est important aussi de noter que la présence d'un gène ne signifie pas nécessairement qu'il est exprimé. Ainsi, la détection des GRAs dans les échantillons environnementaux reflète uniquement le potentiel de résistance des microorganismes (1,19).

4.4 Directions futures

Il n'y a pas de consensus sur la méthode à suivre pour bien documenter le phénomène de résistance (7). La répétabilité des méthodes de détection des gènes par PCR est plutôt difficile à évaluer puisque plusieurs types d'appareils et de polymérases sont employés. Les protocoles d'amplification de l'ADN ainsi que la nature de l'extrait d'ADN ont aussi un impact non négligeable (83). Des méthodes de détection standardisées seraient utiles afin de comparer efficacement les résultats obtenus entre les différentes études. Étant donné le manque de standardisation dans les méthodes utilisées pour surveiller et rapporter la présence de microorganismes résistants aux antimicrobiens, il est possible de supposer que plusieurs cas n'ont pas été rapportés. Il s'agit là d'une raison supplémentaire pour établir une méthode

d'analyse et de surveillance standardisée chez les animaux d'élevage et l'environnement afin de bien connaître l'ampleur du problème des MRAs (7). Les méthodes de séquençage actuels (ex. séquençage Illumina) pourraient aider à comprendre comment les GRAs se déplacent entre les microorganismes (104).

Plusieurs autres études devront être réalisées au Canada comme ailleurs dans le monde afin de bien comprendre le rôle de l'environnement dans la propagation de la résistance antimicrobienne ainsi que le potentiel de celui-ci comme réservoir de GRAs. Les différentes voies de propagation des gènes entre les microorganismes environnementaux et cliniques par le biais des éléments mobiles génétiques doivent aussi davantage être évaluées (43). Aucune recommandation n'a été faite aux agriculteurs concernant les pratiques agricoles dans le but de réduire leurs impacts environnementaux sur la résistance antimicrobienne mondiale. Par ailleurs, les résultats rapportés des différentes études, jusqu'à aujourd'hui, démontrent bien que les épandages à des doses élevées de lisier de porc ont des impacts à plus long terme sur l'abondance des GRAs dans le sol et les végétaux (2,13,19,22,91,103). Étant donné la forte augmentation du nombre de microorganismes résistants aux antimicrobiens qui sont potentiellement pathogènes pour les humains et les animaux, des recommandations claires aux agriculteurs devraient être émises dans les prochaines années (19,30).

CONCLUSION

Ce projet d'étude a permis d'évaluer, en premier lieu, la présence de GRAs dans le sol à différentes profondeurs suite aux épandages répétés de lisier de porc à une dose agronomique en grandes cultures. En second lieu, ce projet a permis d'étudier deux types de travail du sol, soit le travail conventionnel réalisé au chisel et le travail réduit, sur le transport de ces gènes dans l'environnement via l'eau de drainage. Les analyses des échantillons de lisier de porc, de sol et d'eau de drainage ont aussi documenté davantage l'abondance de gènes de résistance aux tétracycline *tet(T)*, aux sulfamides *sul1* ainsi qu'aux β -lactamines *bla_{CTX-M}*. Cette étude a aussi confirmé l'absence des gènes de résistance à la colistine *mcr-1* et *mcr-2* au site expérimental de Saint-Lambert-de-Lauzon, Québec, Canada (27).

Les résultats obtenus ont démontré qu'un épandage de lisier de porc à une dose élevée, correspondant à 45 m³/ha, entraînait l'augmentation de l'abondance des gènes *tet(T)* et *sul1* pendant plus de 4 mois (long terme). Cependant, une dose de 20 m³/ha a eu un impact à court terme et les GRAs semblaient persister moins longtemps dans le sol qu'à une dose élevée. Cette étude n'a tout de même pas pu démontrer que le travail du sol avait un impact sur le transport des GRAs dans l'eau de drainage. Comme il a été rapporté, il y avait des GRAs dans le sol et l'eau de drainage malgré l'absence de fertilisants organiques, ce qui confirme la présence d'un réservoir naturel et environnemental de MRAs (1,13,91).

Puisque la dose de lisier de porc semble avoir un impact sur la persistance de certains GRAs dans le sol, de futures recommandations aux agriculteurs pourraient être émises afin de réduire l'effet des pratiques agricoles sur les réservoirs de GRAs dans l'environnement. Par

ailleurs, plusieurs autres facteurs peuvent jouer un rôle dans la dissémination des GRAs. Des facteurs tels que les différents travaux de sol, le type de sol, les conditions météorologiques ainsi que la source et composition du lisier de porc doivent encore être étudiés. Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet de maîtrise permettent de conclure que les épandages de fertilisants organiques contribuent à augmenter les réservoirs environnementaux de gènes de résistance aux tétracyclines *tet*(T) et aux sulfamides *sul1* pour une durée plus ou moins longue selon la dose de lisier de porc épandue.

BIBLIOGRAPHIE

1. Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol.* mai 2015;13(5):310- 7.
2. Marti R, Tien Y-C, Murray R, Scott A, Sabourin L, Topp E. Safely Coupling Livestock and Crop Production Systems: How Rapidly Do Antibiotic Resistance Genes Dissipate in Soil following a Commercial Application of Swine or Dairy Manure? *Appl Environ Microbiol.* mai 2014;80(10):3258- 65.
3. Chevalier P. L'usage des substances antimicrobiennes en production animale : position des experts et des gouvernements [Internet]. Institut national de santé publique du Québec; 2012 [cité 4 févr 2016] p. 60. Disponible à: https://www.agrireseau.net/bovinsboucherie/documents/1540_UsageSubstAntimicrobProdAnimale_PosiExpertsGouv.pdf
4. ACIA. Recueil des notices sur les substances médicamenteuses [Internet]. Agence canadienne d'inspection des aliments (ACIA). 2018 [cité 4 mars 2018]. Disponible à: <http://www.inspection.gc.ca/animaux/aliments-du-betail/substances-medicatrices/fra/1300212600464/1320602461227#bgd>
5. Pakpour S, Jabaji S, Chénier MR. Frequency of antibiotic resistance in a swine facility 2.5 years after a ban on antibiotics. *Microb Ecol.* janv 2012;63(1):41- 50.
6. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci.* 31 janv 2012;109(5):1691- 6.
7. Organisation mondiale de la Santé. Antimicrobial resistance : Global report on surveillance [Internet]. France: WHO Library; 2014 [cité 11 avr 2016]. 256 p. Disponible à: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1
8. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 15 avr 2005;245(2):195- 203.

9. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin Y-F, Yannarell AC, et al. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *J Environ Qual*. 2009;38(3):1086.
10. Udikovic-Kolic N, Wichmann F, Broderick NA, Handelsman J. Bloom of resident antibiotic-resistant bacteria in soil following manure fertilization. *Proc Natl Acad Sci*. 21 oct 2014;111(42):15202- 7.
11. Zhu Y-G, Johnson TA, Su J-Q, Qiao M, Guo G-X, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci*. 26 févr 2013;110(9):3435- 40.
12. Sollic M, Roy-Lachapelle A, Gasser M-O, Côté C, Gagnéux M, Sauvé S. Fractionation and analysis of veterinary antibiotics and their related degradation products in agricultural soils and drainage waters following swine manure amendment. *Sci Total Environ*. 1 févr 2016;543, Part A:524- 35.
13. Hartmann A, Locatelli A, Amoureux L, Depret G, Jolivet C, Gueneau E, et al. Occurrence of CTX-M Producing *Escherichia coli* in Soils, Cattle, and Farm Environment in France (Burgundy Region). *Front Microbiol* [Internet]. 9 mars 2012 [cité 9 sept 2016];3. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3297819/>
14. Zhang Y, Zhang C, Parker DB, Snow DD, Zhou Z, Li X. Occurrence of antimicrobials and antimicrobial resistance genes in beef cattle storage ponds and swine treatment lagoons. *Sci Total Environ*. 1 oct 2013;463- 464:631- 8.
15. Michel-Briand Y. Une histoire de la résistance aux antibiotiques. Paris: L'Harmattan; 2009. 360 p.
16. Garder JL, Moorman TB, Soupir ML. Transport and Persistence of Tylosin-Resistant Enterococci, Genes, and Tylosin in Soil and Drainage Water from Fields Receiving Swine Manure. *J Environ Qual*. 8/01 2014;43(4):1484- 93.
17. Cools D, Merckx R, Vlassak K, Verhaegen J. Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl Soil Ecol*. 1 mai 2001;17(1):53- 62.

18. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 1 sept 2011;35(5):790- 819.
19. Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol.* 15 janv 2010;44(2):580- 7.
20. Wang F-H, Qiao M, Chen Z, Su J-Q, Zhu Y-G. Antibiotic resistance genes in manure-amended soil and vegetables at harvest. *J Hazard Mater.* 15 déc 2015;299:215- 21.
21. Zhang S, Gu J, Wang C, Wang P, Jiao S, He Z, et al. Characterization of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes on an Ecological Farm System. *J Chem* [Internet]. 2015 [cité 15 août 2017]; Disponible à: <https://www.hindawi.com/journals/jchem/2015/526143/>
22. Heuer H, Smalla K. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environ Microbiol.* 1 mars 2007;9(3):657- 66.
23. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett.* 15 avr 2005;245(2):195- 203.
24. Marti R, Scott A, Tien Y-C, Murray R, Sabourin L, Zhang Y, et al. Impact of Manure Fertilization on the Abundance of Antibiotic-Resistant Bacteria and Frequency of Detection of Antibiotic Resistance Genes in Soil and on Vegetables at Harvest. *Appl Environ Microbiol.* sept 2013;79(18):5701- 9.
25. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother.* juin 2000;3(3):155- 60.
26. Aiello ES, éditeur. The Merck veterinary manual [Internet]. Onzième édition. États-Unis; 2016. 3325 p. Disponible à: <http://www.merckvetmanual.com/>
27. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents.* août 2016;48(2):119- 26.
28. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Bergeron N, Beauchamp G, Laurent-Lewandowski S, et al. In vivo therapeutic efficacy and pharmacokinetics of colistin sulfate in an experimental model of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in weaned pigs. *Vet Res*

- [Internet]. 2016 [cité 12 janv 2018];47. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4884413/>
29. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(8):2066- 70.
 30. Agence de la santé publique du Canada. Système Canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens - Rapport de 2016. Canada; 2016 sept p. 122.
 31. Smet A, Van Nieuwerburgh F, Vandekerckhove TTM, Martel A, Deforce D, Butaye P, et al. Complete nucleotide sequence of CTX-M-15-plasmids from clinical *Escherichia coli* isolates: insertional events of transposons and insertion sequences. *PloS One*. 2010;5(6):e11202.
 32. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. juin 2010;8(6):423- 35.
 33. Kapoor G, Saigal S, Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*. 2017;33(3):300- 5.
 34. Rhouma M, Beaudry F, Thériault W, Letellier A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front Microbiol* [Internet]. 11 nov 2016 [cité 12 janv 2018];7. Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5104958/>
 35. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Perspect Med Chem*. 28 août 2014;6:25- 64.
 36. Bermingham A, Derrick JP. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. juill 2002;24(7):637- 48.
 37. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilonis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Med Kaunas Lith*. 2011;47(3):137- 46.
 38. Zhou Z, Raskin L, Zilles JL. Macrolide Resistance in Microorganisms at Antimicrobial-Free Swine Farms. *Appl Environ Microbiol*. 15 sept 2009;75(18):5814- 20.

39. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* [Internet]. avr 2016 [cité 19 mars 2018];4(2). Disponible à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4888801/>
40. Amyes SGB. *Bacteria: A Very Short Introduction*. OUP Oxford; 2013. 162 p.
41. Ashbolt NJ, Amézquita A, Backhaus T, Borriello P, Brandt KK, Collignon P, et al. Human Health Risk Assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*. sept 2013;121(9):993 - 1001.
42. Top EM, Springael D. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr Opin Biotechnol*. 1 juin 2003;14(3):262 - 9.
43. Gaze WH, Zhang L, Abdouslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, et al. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J*. août 2011;5(8):1253 - 61.
44. Kyselková M, Jirout J, Vrchotová N, Schmitt H, Elhottová D. Spread of tetracycline resistance genes at a conventional dairy farm. *Front Microbiol* [Internet]. 29 mai 2015 [cité 29 avr 2016];6. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4448040/>
45. Roberts MC. Update on macrolide–lincosamide–streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol Lett*. 1 mai 2008;282(2):147 - 59.
46. Chen J, Michel FC, Sreevatsan S, Morrison M, Yu Z. Occurrence and Persistence of Erythromycin Resistance Genes (erm) and Tetracycline Resistance Genes (tet) in Waste Treatment Systems on Swine Farms. *Microb Ecol*. 1 oct 2010;60(3):479 - 86.
47. Haroche J, Allignet J, Buchrieser C, Solh NE. Characterization of a Variant of vga(A) Conferring Resistance to Streptogramin A and Related Compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 9 janv 2000;44(9):2271 - 5.
48. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother*. févr 2005;49(2):836 - 9.
49. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. juin 2000;3(3):155 - 60.

50. Sujatha S, Praharaj I, Sujatha S, Praharaj I. Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review, Glycopeptide Resistance in Gram-Positive Cocci: A Review. *Interdiscip Perspect Infect Dis Interdiscip Perspect Infect Dis*. 19 juin 2012;2012, 2012:e781679.
51. Agga GE, Arthur TM, Durso LM, Harhay DM, Schmidt JW. Antimicrobial-Resistant Bacterial Populations and Antimicrobial Resistance Genes Obtained from Environments Impacted by Livestock and Municipal Waste. *PLOS ONE*. 21 juill 2015;10(7):e0132586.
52. Boerlin P, Travis R, Gyles CL, Reid-Smith R, Lim NJH, Nicholson V, et al. Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. *Appl Environ Microbiol*. 11 janv 2005;71(11):6753- 61.
53. Jackson CR, Davis JA, Frye JG, Barrett JB, Hiott LM. Diversity of Plasmids and Antimicrobial Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Healthy Companion Animals. *Zoonoses Public Health*. 1 sept 2015;62(6):479- 88.
54. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. févr 2016;16(2):161- 8.
55. Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 7 juill 2016;21(27).
56. Kluytmans J. Plasmid-encoded colistin resistance: *mcr-one*, two, three and counting. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 3 août 2017;22(31).
57. Lewis K. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*. mai 2013;12(5):371- 87.
58. Chopra I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug Resist Updat*. 1 juin 2002;5(3):119- 25.
59. Clermont D, Chesneau O, Cespédès GD, Horaud T. New tetracycline resistance determinants coding for ribosomal protection in streptococci and nucleotide sequence of

- tet(T) isolated from *Streptococcus pyogenes* A498. *Antimicrob Agents Chemother.* 1 janv 1997;41(1):112- 6.
60. Brenciani A, Bacciaglia A, Vecchi M, Vitali LA, Varaldo PE, Giovanetti E. Genetic Elements Carrying *erm*(B) in *Streptococcus pyogenes* and Association with *tet*(M) Tetracycline Resistance Gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 4 janv 2007;51(4):1209- 16.
 61. Koike S, Aminov RI, Yannarell AC, Gans HD, Krapac IG, Chee-Sanford JC, et al. Molecular Ecology Of Macrolide–Lincosamide–Streptogramin B Methylases in Waste Lagoons and Subsurface Waters Associated with Swine Production. *Microb Ecol.* 1 avr 2010;59(3):487- 98.
 62. Juntunen P, Heiska H, Olkkola S, Myllyniemi A-L, Hänninen M-L. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. *Vet Microbiol.* 20 nov 2010;146(1):90- 7.
 63. Page MI. *The Chemistry of β -Lactams.* Springer Science & Business Media; 2012. 368 p.
 64. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol* [Internet]. 2 avr 2012 [cité 9 sept 2016];3. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3316993/>
 65. Rodríguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, et al. Chromosome-Encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a Possible Origin of Plasmid-Borne CTX-M-1-Derived Cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother.* déc 2004;48(12):4895- 7.
 66. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* 1 août 2014;22(8):438- 45.
 67. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, et al. *PmrA–PmrB*- regulated genes necessary for 4- aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol.* 1 mars 1998;27(6):1171- 82.
 68. ASPC. *Système canadien de surveillance de la résistance aux antimicrobiens – Rapport de 2016* [Internet]. Canada: Agence de la santé publique du Canada (ASPC); 2016 sept.

Disponible à: <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/publications/medicaments-et-produits-sante/systeme-canadien-surveillance-resistance-antimicrobiens-rapport-2016.html>

69. Cromwell GL. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim Biotechnol.* mai 2002;13(1):7- 27.
70. Heuer H, Kopmann C, Binh CTT, Top EM, Smalla K. Spreading antibiotic resistance through spread manure: characteristics of a novel plasmid type with low %G+C content. *Environ Microbiol.* 1 avr 2009;11(4):937- 49.
71. Joung YS, Ge Z, Buie CR. Bioaerosol generation by raindrops on soil. *Nat Commun.* 7 mars 2017;8:ncomms14668.
72. de Castro AP, Fernandes G da R, Franco OL. Insights into novel antimicrobial compounds and antibiotic resistance genes from soil metagenomes. *Front Microbiol* [Internet]. 18 sept 2014 [cité 23 avr 2016];5. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4166954/>
73. Joy SR, Bartelt-Hunt SL, Snow DD, Gilley JE, Woodbury BL, Parker DB, et al. Fate and Transport of Antimicrobials and Antimicrobial Resistance Genes in Soil and Runoff Following Land Application of Swine Manure Slurry. *Environ Sci Technol.* 5 nov 2013;47(21):12081- 8.
74. Ghosh S, LaPara TM. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *ISME J.* 24 mai 2007;1(3):191- 203.
75. Jensen LB, Baloda S, Boye M, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environ Int.* 1 juin 2001;26(7):581- 7.
76. Sengeløv G, Agersø Y, Halling-Sørensen B, Baloda SB, Andersen JS, Jensen LB. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environ Int.* 1 janv 2003;28(7):587- 95.

77. Zhou Z, Raskin L, Zilles JL. Effects of Swine Manure on Macrolide, Lincosamide, and Streptogramin B Antimicrobial Resistance in Soils. *Appl Environ Microbiol.* avr 2010;76(7):2218- 24.
78. Bernard C, Côté C, Côté D, Giroux M, Grégoire R, Joncas R, et al. Mémoire de l'Institut de recherche et de développement en agroenvironnement inc. [Internet]. Institut de Recherche et de Développement en Agroenvironnement inc.; 2003. Disponible à: <http://www.bape.gouv.qc.ca/sections/mandats/prod-porcine/documents/MEMO303.pdf>
79. van Groenigen K-J, Bloem J, Bååth E, Boeckx P, Rousk J, Bodé S, et al. Abundance, production and stabilization of microbial biomass under conventional and reduced tillage. *Soil Biol Biochem.* janv 2010;42(1):48- 55.
80. Jamieson RC, Gordon RJ, Sharples KE, Stratton GW, Madani A. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: a review. *Can Biosyst Eng Génie Biosystèmes Au Can* [Internet]. 2002 [cité 4 août 2017];44. Disponible à: <http://csbe-scgab.ca/publications/cbe-journal/browse/3555-movement-and-persistence-of-fecal-bacteria-in-agricultural-soils-and-subsurface-drainage-water-a-review>
81. Stoddard CS, Coyne MS, Grove JH. Fecal Bacteria Survival and Infiltration through a Shallow Agricultural Soil: Timing and Tillage Effects. *J Environ Qual.* 12/01 1998;27(6):1516- 23.
82. McLain JE, Cytryn E, Durso LM, Young S. Culture-based Methods for Detection of Antibiotic Resistance in Agroecosystems: Advantages, Challenges, and Gaps in Knowledge. *J Environ Qual.* 04/01 2016;45(2):432- 40.
83. Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johnes R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *J Appl Microbiol.* 1 nov 2012;113(5):1014- 26.
84. Payment P, Locas A. Pathogens in Water: Value and Limits of Correlation with Microbial Indicators. *Ground Water.* 1 janv 2011;49(1):4- 11.

85. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations [Internet]. 2016 mai. Disponible à: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf
86. Pakpour S, Jabaji S, Chénier MR. Frequency of Antibiotic Resistance in a Swine Facility 2.5 Years After a Ban on Antibiotics. *Microb Ecol.* 1 janv 2012;63(1):41 - 50.
87. Brown K, Uwiera RRE, Kalmokoff ML, Brooks SPJ, Inglis GD. Antimicrobial growth promoter use in livestock: a requirement to understand their modes of action to develop effective alternatives. *Int J Antimicrob Agents.* 1 janv 2017;49(1):12 - 24.
88. Zhu Y-G, Johnson TA, Su J-Q, Qiao M, Guo G-X, Stedtfeld RD, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc Natl Acad Sci.* 26 févr 2013;110(9):3435 - 40.
89. Frey SK, Topp E, Khan IUH, Ball BR, Edwards M, Gottschall N, et al. Quantitative *Campylobacter* spp., antibiotic resistance genes, and veterinary antibiotics in surface and ground water following manure application: Influence of tile drainage control. *Sci Total Environ.* 1 nov 2015;532(Supplement C):138 - 53.
90. Looft T, Johnson TA, Allen HK, Bayles DO, Alt DP, Stedtfeld RD, et al. In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proc Natl Acad Sci.* 31 janv 2012;109(5):1691 - 6.
91. Marti R, Scott A, Tien Y-C, Murray R, Sabourin L, Zhang Y, et al. Impact of manure fertilization on the abundance of antibiotic-resistant bacteria and frequency of detection of antibiotic resistance genes in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol.* sept 2013;79(18):5701 - 9.
92. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* 1 déc 2017;72(12):3317 - 24.

93. Meen VS, Maurya BR, Meena* RS, Meena SK, Singh NP, Malik VK, et al. Microbial dynamics as influenced by concentrate manure and inorganic fertilizer in alluvium soil of Varanasi, India. *Afr J Microbiol Res.* 15 janv 2014;8(3):257- 63.
94. Baquero F, Martínez J-L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 1 juin 2008;19(3):260- 5.
95. Dohmen W, Bonten MJM, Bos MEH, van Marm S, Scharringa J, Wagenaar JA, et al. Carriage of extended-spectrum β -lactamases in pig farmers is associated with occurrence in pigs. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* oct 2015;21(10):917- 23.
96. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet Scand.* 19 mai 2017;59:31.
97. Guenther S, Falgenhauer L, Semmler T, Imirzalioglu C, Chakraborty T, Roesler U, et al. Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *J Antimicrob Chemother.* 1 mai 2017;72(5):1289- 92.
98. Sura S, Degenhardt D, Cessna AJ, Larney FJ, Olson AF, McAllister TA. Transport of Three Antimicrobials in Runoff from Windrows of Composting Beef Cattle Manure. *J Environ Qual.* 04/01 2016;45(2):494- 502.
99. Parent L-É, Gagné G, éditeurs. Guide de référence en fertilisation, 2e édition. Québec: CRAAQ; 2010. 473 p.
100. Schmidt GV, Møllerup A, Christiansen LE, Ståhl M, Olsen JE, Angen Ø. Sampling and Pooling Methods for Capturing Herd Level Antibiotic Resistance in Swine Feces using qPCR and CFU Approaches. *PLOS ONE.* 26 juin 2015;10(6):e0131672.
101. Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, et al. Development, Validation, and Application of PCR Primers for Detection of Tetracycline Efflux Genes of Gram-Negative Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 4 janv 2002;68(4):1786- 93.

102. Zhang X, Liu D, Zhang S, Wei X, Song J, Zhang Y, et al. Host-virus interaction: the antiviral defense function of small interfering RNAs can be enhanced by host microRNA-7 in vitro. *Sci Rep* [Internet]. 12 juin 2015 [cité 11 sept 2015];5. Disponible à: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464290/>
103. Heuer H, Schmitt H, Smalla K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol*. 1 juin 2011;14(3):236- 43.
104. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 1 mars 2008;24(3):133- 41.